ANNÉE SCOLAIRE
1970-1971
N° d'Ordre: 7

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

Unité d'Enseignement et de Recherche de Pharmacie

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

PAR

Pierre BABIN

Pharmacien. Interne des Hôpitaux de Bordeaux
Assistant - délégué à la Faculté de Pharmacie de Bordeaux
Titulaire du C.E.S. de Contrôle physico-chimique des médicaments
et du C.E.S. de Pharmacie Industrielle

né le 21 Novembre 1942 à BORDEAUX (Gironde)

1° Thèse: **LE LYSOZYME: Études concernant son usage thérapeutique.**

2° **Proposition donnée par la Faculté :**
La chimiothérapie antinéoplasique.

Présentées et soutenues publiquement le Mardi 27 Juillet 1971
devant la Commission d'Examen :

MM.	J. MASQUELIER, Professeur	PRÉSIDENT
	J. CANELLAS, Professeur	EXAMINATEURS
	E. JOUZIER, Maître de Conférences Agrégé	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543911_0035

ANNÉE SCOLAIRE
1970-1971
N° d'Ordre : 7

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

Unité d'Enseignement et de Recherche de Pharmacie

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

PAR

Pierre BABIN

Pharmacien. Interne des Hôpitaux de Bordeaux
Assistant - délégué à la Faculté de Pharmacie de Bordeaux
Titulaire du C.E.S. de Contrôle physico-chimique des médicaments
et du C.E.S. de Pharmacie Industrielle

né le 21 Novembre 1942 à BORDEAUX (Gironde)

1° Thèse : **LE LYSOZYME : Études concernant son usage thérapeutique.**

2° **Proposition donnée par la Faculté :**
La chimiothérapie antinéoplasique.

Présentées et soutenues publiquement le Mardi 27 Juillet 1971
devant la Commission d'Examen :

MM. J. MASQUELIER, Professeur . . . . . PRÉSIDENT

J. CANELLAS, Professeur . . . . . } EXAMINATEURS

E. JOUZIER, Maître de Conférences Agrégé }

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MA FEMME,

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS,

A Madame DUTHOIT, Madame CARRERE et à Madame BLASCO

qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

A Mademoiselle MOURIES

Pharmacien-assistante de Pharmacodynamie

qui a contribué à la partie expérimentale.

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE :

Mademoiselle BUY, Monsieur COUPRIE, *Assistants*
Mademoiselle BONNEMAZOU et Monsieur BONIN, *Moniteurs*.

A Monsieur R. BABIN

Professeur de Pharmacie Chimique

Toute ma filiale gratitude.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE .

A Monsieur F. COUSTOU

Maître de Conférences agrégé de Législation Pharmaceutique
Licencié en Droit
Officier des Palmes académiques

Dont la haute autorité en matière thérapeutique nous a été si précieuse ainsi que les conseils et les encouragements maintes fois prodigués.

A Monsieur le Professeur Guy DEVAUX

Professeur sans Chaire de Pharmacie Chimique
Licencié ès Sciences

Vous avez permis nos premiers pas d'enseignant ; veuillez recevoir l'expression de nos sentiments reconnaissants.

A Monsieur le Professeur E. JOUZIER

Maître de Conférences agrégé de Biochimie
Licencié ès Sciences

Vous nous avez témoigné votre sympathie en acceptant de juger ce travail.
Veuillez croire à nos sentiments de vive gratitude.

A Monsieur le Professeur J. CANELLAS

Professeur de Pharmacodynamie et d'Hydrologie
Licencié ès Sciences
Officier des Palmes académiques

Vous avez contribué pour une part importante à l'élaboration de ces travaux en mettant à notre disposition le personnel et les moyens techniques de votre laboratoire.
Veuillez accepter notre profonde reconnaissance et nos remerciements pour avoir bien voulu, en outre, siéger dans ce jury.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur J. MASQUELIER

Docteur ès Sciences
Directeur de l'U.E.R. de Pharmacie
Doyen de la Faculté de Pharmacie de Bordeaux
Professeur de Matière médicale
Officier des Palmes académiques
Chevalier du Mérite agricole

Malgré vos nombreuses obligations, vous nous avez accordé avec une bienveillante patience une partie de votre temps précieux.
Veuillez nous permettre de vous exprimer nos remerciements déférents, ainsi que notre respectueuse reconnaissance.

LE LYSOZYME :

Etudes concernant son usage thérapeutique .

PREAMBULE

Avant d'exposer notre travail, sur l'usage thérapeutique du lysozyme, nous croyons pouvoir rapporter une opinion de Monsieur le Doyen MALANGEAU concernant l'orientation de la Pharmacie :

"NOS MEDICAMENTS DE DEMAIN SERONT SANS AUCUN DOUTE D'INSPIRATION BIOCHIMIQUE". (76)

PLAN DE LA THESE

Introduction concernant l'emploi thérapeutique du lysozyme.

*

PREMIERE PARTIE

Rappel de travaux antérieurs.

*

DEUXIEME PARTIE

Partie expérimentale.

*

CHAPITRE 1 - Travaux personnels relatifs aux dosages du lysozyme.

CHAPITRE 2 - La sensibilité du lysozyme vis-à-vis des agents d'oxydation.

CHAPITRE 3 - La thermostabilité du lysozyme.

CHAPITRE 4 - Le lysozyme destiné à la voie orale.
La dialyse du lysozyme.
Comportement du lysozyme en présence d'enzymes digestifs, de quelques médicaments et d'hôtes de l'intestin.

CHAPITRE 5 - Le lysozyme destiné à la voie injectable.
L'antigénicité du lysozyme.

CHAPITRE 6 - Lysozymes autres que ceux du blanc d'œuf.
Lysozyme des globules blancs humains.
Leur antigénicité.
Action tumoro-statique expérimentale.

CHAPITRE 7 - Essais d'extraction de lysozymes végétaux.

*

CONCLUSIONS GENERALES

BIBLIOGRAPHIE

Table des Matières

*

INTRODUCTION

Il est possible que ce soit NICOLLE (84) en 1907, puis LASCHTSCHENKO (69) en 1909, qui aient les premiers signalé la présence d'enzymes douées de propriétés bactériolytiques dans B. subtilis, et dans le blanc d'œuf de poule.

La majorité des auteurs cependant accorde à A. FLEMING (34) (35) l'annonce, en 1922, de la mise en évidence des propriétés lytiques d'une substance contenue dans le mucus nasal, le blanc d'œuf des oiseaux, des poules en particulier. A l'époque, il se contenta de l'appeler la "protéine lysante" du blanc d'œuf dénommée par la suite "lysozyme".

Les travaux de DOMAGK puis de TREFOUEL précisèrent dans les années 1934-1939 la bactériostase grâce à la découverte des SULFAMIDES; mais c'est en 1939 avec la TYROTHRICINE de DUBOS, puis en 1945 avec WAKSMAN, que la notion de bactériostase + bactériolyse, c'est-à-dire le pouvoir antibiotique, fut mise en évidence.

Si on retourne alors à la remarque initiale de FLEMING sur la constatation de la stérilité de l'œuf dans le milieu septique où il est pondu, on peut affirmer que le premier antibiotique réellement isolé a été cette protéine lysante.

Malgré la fécondité de cette observation, il faudra attendre près de 30 années pour en retenir des applications thérapeutiques humaines et voir apparaître dans l'arsenal thérapeutique, des MEDICAMENTS à base ou contenant du LYSOZYME.

En 1967, à Paris, les Journées Pharmaceutiques Françaises furent en partie consacrées à l'enzymothérapie mais le lysozyme n'y fut pas évoqué. En 1971, le programme de la réunion internationale de Chimie Thérapeutique a pour thème principal :

"ENZYMES et MEDICAMENTS EFFECTEURS D'ENZYMES".

Qu'il s'agisse de GLUCIDOLYSE proprement dite ou d'antibiose, nous verrons que le problème mérite des recherches allant de l'utilisation du LYSOZYME BASE au CHLORHYDRATE de LYSOZYME amorphe pour les usages oraux et au chlorhydrate de LYSOZYME cristallisé pour la voie injectable.

Le dosage du lysozyme retiendra spécialement notre attention. De lui dépend la valeur des médicaments qui en contiennent.

Nous insisterons également sur l'antigénicité de la molécule protéique et essaierons de prouver que le problème de son allergie n'est peut-être pas insurmontable.

Il est bien évident que nous ne pouvons signaler que partiellement l'énorme travail consacré à cette enzyme douée de propriétés antibiotiques. Rien que les références publiées aux divers symposiums sur le lysozyme à Milan en 1959, 1961, 1964, et probablement depuis, forment à elles seules un volumineux ouvrage.

C'est dire que nous limiterons l'index bibliographique aux points essentiels que nous avons étudiés ayant éliminé la majorité des communications dites "cliniques".

Ce sera uniquement pour justifier nos recherches que nous rappellerons les travaux antérieurs spécialement relatifs à ces recherches .

Nous signalons au préalable quels sont les médicaments auxquels nous faisons allusion.

- En 1970, les principaux produits à base de lysozyme concernent :

1°- Des préparations orales, sous forme de comprimés de chlorhydrate de lysozyme à 10 mg en France ;

2, 10, 100, 250 mg en Italie et dans les pays d'Europe Centrale, où on l'appelle ANTALZYME.

2°-Des préparations injectables de poudre de chlorhydrate de lysozyme pur et stérile. L'injection de 25, 75, 100 mg/jour après dissolution en solvant isotonique a lieu par voie intra-musculaire.
La voie endoveineuse est quelquefois recherchée, et avec des doses atteignant 500 mg par injection.

3°-Des poudres d'usage externe, des pommades à 1 p. 100 , des collyres à 2 p. 100 de chlorhydrate de lysozyme sont aussi utilisés.

- Parmi les médicaments contenant du lysozyme, mentionnons les associations papaïne-lysozyme pour l'ORL en solution extemporanée à 0, 4 p. 100 de papaïne et 3 p. 100 de chlorhydrate de lysozyme; celles de tétracycline base, de propionyl érythromycine et de chlorhydrate de lysozyme par voie orale (250 mg, 150 mg, 10 mg) en comprimés ou en sachets à doses plus faibles; l'association papaïne-lysozyme base - bacitracine aux concentrations respectives de 2 mg, 5 mg, 200 UI en comprimés sub-linguaux.

PREMIERE PARTIE

TRAVAUX ANTERIEURS

I

DENOMINATIONS DE L'ENZYME ET LE PROBLEME DES SUBSTRATS

*

Nous allons rappeler les recherches diverses concernant le lysozyme qui ont abouti à une nouvelle appellation de l'enzyme plus conforme à son effet sur un substrat spécifique . Alors que la formule développée de l'enzyme est établie, paradoxalement l'accord reste à réaliser sur celle de son substrat .

Dénommée, nous l'avons dit initialement, "lysozyme" par FLEMING en raison de la lyse d'un certain nombre de germes sous son action, cette désignation est encore celle que retiennent en 1942, WAKSMAN et WOODRUFF (110) pour l'étude particulière de ses propriétés bactériologiques et antibiotiques .

Malgré la remarque pertinente de 1960 de JOLLÈS (58) sur la nature différente des protéines constituant les produits extraits de sources autres que le blanc d'œuf de poule, la "famille d'enzymes" possédant la propriété lytique, conserve pour tous les produits extraits , l'ancienne appellation de FLEMING .

La lyse des parois de Micrococcus lysodeikticus et l'appellation lysozyme figuraient d'ailleurs antérieurement dans le traité de 1951 de SUMNER et MYRBÄCK (106) avec toutefois un début de spécification ; le lysozyme est classé par ces auteurs dans le groupe des MUCASES , mucopolysaccharidase avec, comme substrat, celui indiqué par FLEMING au M. lysodeikticus et encore utilisé en 1946 par MEYER et HAHNEL (77) .

Cependant, ces deux auteurs hydrolysant davantage le substrat mucopolysaccharidique le trouvent

contenir de 5, 5 à 6, 5 p. 100 d'azote et de 23 à 30 p. 100 d'hexosamine.

La digestion enzymatique pendant 2 heures fait apparaître des substances réductrices correspondant dans les conditions expérimentales décrites à 10 p. 100 de sucres réducteurs exprimés en glucose : la moitié de cette valeur peut être déterminée comme acétylglucosamine.

A partir de 1955, COLOWICK et KAPLAN (26) signalent la libération de nucléotides par lyse complète des microbes par le lysozyme. On peut se demander si de ce fait une autre dénomination va être proposée.

Le lysozyme sera en effet utilisé pour préparer l'acide desoxyribonucléique de nombreux germes, dont celui d'E. coli, d'abord avec le lysozyme seul, puis en présence d'EDTA.

Il sera également mis à contribution pour extraire les endo-enzymes microbiennes, et tous les constituants des germes, dont ceux de son "réactif biologique" M. lysodeikticus à la concentration de 1 mg de lysosyme pour 1 gramme de corps microbiens desséchés.

La polymérase de l'acide ribonucléique, la replicase de ce même acide, capables de synthétiser des virus à RNA biologiquement actifs, sont préparées à l'aide de lysozyme.

Il en sera de même pour l'extraction par le lysozyme en présence d'EDTA des polyribosomes de B. megatherium et pour la phosphatase alcaline d'E. coli.

L'extraction des "spheroplastes" est obtenue par attaque complète de cellules bactériennes par le lysozyme.

Toutes ces préparations de constituants cellulaires peuvent d'ailleurs être obtenues avec d'autres enzymes mais c'est la libération des contenus intra-cellulaires microbiens par la lyse des parois qui est réalisée ici par le lysozyme.

JAVILLIER et coll. (53) en 1964, considèrent également le lysozyme par ses propriétés lytiques des parois cellulaires microbiennes et le désignent comme MURAMINIDASE. Cette molécule est constituée d'une

seule chaîne peptidique, avec 18 amino-acides exprimés pondéralement pour 100 g de protéine. Ils montrent que 70 p. 100 de l'enzyme sont inactivés par la destruction de 1 mole d'histidine et 1, 2 moles de tryptophane, ce qui renseigne sur l'importance du centre actif de l'enzyme.

DIXON et WEBB (30) dans leur édition de 1964 abandonnent l'appellation lysozyme et la remplacent (pas toujours) par celle de MURAMIDASE. L'état cristallin des divers échantillons de muramidase est également présenté avec des microphotographies de cristaux de muramidase d'œuf de poule.
Ces formes cristallines appartiennent à des systèmes différents, une symétrie ternaire conduisant à une hémiédrie hexagonale pour la première forme, et à des octaèdres orthorhombiques plus ou moins troncaturés pour la muramidase d'œuf (deuxième forme) et celle de rate de lapin, isolée par JOLLÈS et FROMAGEOT -(62).

En 1966, GHUYSEN, TIPPER, STROMINGER (38) retiennent l'appellation d'ACETYL-MURAMIDASE pour les lysozymes classés dans les ENDOACETYL-MURAMIDASES végétales et animales agissant sur les liaisons N-acetylmuramyl-N-acetyl glucosamine. Il s'agit en particulier des lysozymes extraits de Streptomyces albus, et le T_2 phage lysozyme.

Cette mise au point fait ressortir l'emploi de la réaction d'ELSON et MORGAN que nous avons utilisée dans nos travaux personnels. Ils recommandent le réactif au paradimethyl-amino benzaldéhyde d'EHRLICH et KOVACS pour la colorimétrie de l'acetyl-glucosamine selon les détails annoncés par REISSIG, STROMINGER et LELOIR (96) sans acétylacétone, avec des étalons de N-acétyl glucosamine en tampon borate.

Ce changement d'appellation du lysozyme est basé sur les résultats de l'hydrolyse des parois des germes de M. lysodeikticus et de S. aureus en N-acétylglucosamine et en acide N-acétyl muramique. Le lysozyme possède une action d'acétylglucosamidase et d'acétylmuramidase. Les carboxyles terminaux de la D-alanine et les amino groupes de la L-lysine obtenus également par action de l'enzyme sur E. coli, et sur M. roseus, justi-

fient pour ces auteurs la qualification d'acétylmuramidase et plus encore d'acétylmuramyl-L alanine amidase.

*

Le problème de la définition et du choix du substrat aussi bien pour la dénomination de l'enzyme que pour son dosage, va prendre de plus en plus d'importance.

Déjà, en 1946, MEYER et HAHNEL (77) avaient constaté combien il était illogique d'utiliser un substrat hydro-insoluble. Ils ont, les premiers, extrait un polyholoside des parois de M. lysodeikticus par action de soude 0, 5 N pendant 7 à 8 jours, à 25° C et en atmosphère d'azote. Un second traitement à peu près identique pendant 14 jours suivi de précipitations éthanoliques puis à l'acétate de zinc et nouvelle précipitation éthanolique, leur a fourni un substrat hydrosoluble et visqueux qui les a incités à doser l'enzyme par viscosimétrie.

En 1958, SCHUTTE et KRISCH (97) ont préparé eux aussi un nouveau substrat hydrosoluble à partir des germes de M. lysodeikticus traités également en milieu alcalin.

Enfin, en 1961, DIRHEIMER (29) analysant le substrat préparé par les auteurs précédents a réussi à obtenir un substrat hydrosoluble électrophorétiquement pur par passage sur diéthylamino-éthylcellulose.

En 1965, la Commission de la Fédération Internationale Pharmaceutique (F. I. P.) chargée de proposer une standardisation des méthodes d'analyse des enzymes rappelle que le substrat doit être défini le mieux possible.

Il faut que la vitesse des réactions enzymatiques soit d'ordre 0 - réactions monomoléculaires - afin de pouvoir justifier l'utilisation de la relation de MICHAELIS et MENTEN :

$$V = \frac{kE}{1 + km\ S}$$

autrement dit avec une certaine grandeur du rapport $\frac{E}{S}$ de telle sorte que $V = kE$.

Ceci n'est possible que pour S constant. Seuls les substrats hydrosolubles peuvent convenir.

Théoriquement séduisante, les recommandations de la F. I. P. sont tempérées par leurs auteurs (J. Mondial de la Pharmacie 1965, n° 1, p. 11).

a) Une trop forte concentration de substrat peut produire une inhibition de l'enzyme, ce que DENIS (28) a constaté dans sa thèse sur la catalase, où le substrat -H_2O_2- est parfaitement hydrosoluble.

b) L'utilisation des substrats synthétiques présente quelques inconvénients et l'analyse des mélanges d'enzymes devient "longue, onéreuse, et inappropriée".

Ces remarques de la F. I. P. expliquent la lenteur du travail de standardisation malgré la description des cristal-enzymes de 1955, par NORTHROP, KUNITZ et HERRIOTT (87).

Seules, en 1971, les enzymes suivantes sont dosées selon les recommandations de la F. I. P. :

1er rapport : trypsine, chymotrypsine, papaïne, hyaluronidase.
2ème rapport : pepsine.
3ème rapport : inhibiteur de la trypsine.

Toutefois, la commission du Codex français n'a retenu que les dosages de la chymotrypsine, de l'hyaluronidase, de la trypsine, les autres enzymes figurant sur la liste des monographies réservées.

Depuis cette période, les recherches en vue de préparer un substrat spécifique hydrosoluble se sont poursuivies dans de nombreux laboratoires.

En 1966, SHARON, JOLLÈS et JOLLÈS (99) montrent que le "tétrasaccharide",

N-acétyl β-D glycosaminyl (1 → 4)
N-acétyl β-muraminyl (1 → 4)
N-acétyl β-D glucosaminyl (1 → 4)
N-acétyl muramique,

par abréviation (NAG-NAM-NAG-NAM), est hydrolysé par le lysozyme de blanc d'œuf de poule.

Cette constatation entraîne la nouvelle appellation du lysozyme :

ACETYL MURAMIDE GLYCANOHYDROLASE.

Ce substrat est l'un de ceux préparés par JEANLOZ et SHARON (56) . Le dosage enzymatique repose sur une fluorescence de chromatogrammes sur papier en solvants n butanol-acide acétique - eau (25 : 6 : 25) en présence de traces de pyridine. La révélation est réalisée par NaOH 0, 5 N dans le mélange éthanol-propanol (6 : 4) puis chauffage 5 mn à 120° avant la lecture sous lampe à U.V.

Le tétrasaccharide est hydrolysé en disaccharide NAG-NAM, mais la réaction est limitée et s'arrête lorsque la libération du disaccharide atteint 60 à 70 p. 100.

En outre, la vitesse d'hydrolyse est fonction de l'activité spécifique de l'enzyme et varie considérablement d'un groupe de lysozymes à un autre groupe.

Les auteurs signalent également une réaction de transglycosylation apparaissant avec les substrats de polymères de N-acétylglucosamine de la chitine - chitotétraose -.

Nous utiliserons cette acquisition dans nos travaux de caractérisation et essais de dosages à l'aide de la réaction d'ELSON et MORGAN.

En 1964, JEANLOZ (54) puis en 1966 (55) a essayé de préparer des substrats de synthèse spécifiquement muramidasiques.

La liaison glycosidique de l'acide muramique $\beta - D\ (1 \rightarrow 6)$ avec l'acétylglucosamine est difficile à reconstituer.

Aussi, après avoir montré toutes les difficultés de la synthèse directe, JEANLOZ revient-il à un substrat provenant du fractionnement des parois de M. lysodeikticus avec le rendement très faible de 0, 4 p. 100.

Par des détails de technique, l'auteur arrive à proposer l'utilisation de ces fractions, diosidiques et tétraosidiques.

Cependant, les dosages de JEANLOZ utilisant les substrats de synthèse ou ceux provenant du fractionnement des parois de M. lysodeikticus donnent des résultats divergents. Aussi l'auteur ne propose-t-il pas le choix d'un de ses substrats.

THOMAS (108) également en 1966 a cherché à synthétiser un substrat d'acétamido-oses.

En 1965 et 1966, MAKSIMOV et coll. (74) (75) fragmentent la chitine en vue d'obtenir des substrats hydrosolubles et prétendent utiliser une chito-dextrine.

Cette même année, OSAWA et coll. (90) ont synthétisé un substrat complexe triholoside d'acétylamino deoxyglucose de p-nitrophénol, le p-nitrophényl 0-(2 acétamido 2 deoxy β-D glucopyranosyl) (1 → 4) 0-(2 acétamido-2 deoxy β-D glucopyranosyl) (1 → 4) -2 acétamido 2 deoxy β-D glucopyranoside).

Ce substrat s'hydrolyserait très rapidement sous l'effet du lysozyme et par son nitrophénol, permet un dosage colorimétrique, ce qui constitue une certaine innovation.

L'année suivante, YAMAMOTO et coll. (114) ont légèrement modifié le substrat d'OSAWA et utilisent le phényl 6-0 (2 acétamido-2-deoxy β-D glucopyranosyl) -2 acétamido-3-0-(D-1' carboxyéthyl)-2-deoxy β-D glucopyranoside, mais reconnaissent que le lysozyme n'agit sur lui que très faiblement.

Toujours en 1967, KRAVCHENKO et coll (68) recherchant eux aussi l'action spécifique muramidasique, utilisent un chitotétraose qui, d'après eux, montre une grande sélectivité. Cependant, ils ne retrouvent pas l'action du tampon borate conseillé par REISSIG, STROMINGER et LELOIR (96); au contraire, ce dernier réduirait l'activité à 16 p. 100 seulement de celle notée en tampon phosphate. Ca^{++} et Mg^{++} inactiveraient l'action muramidasique sur leur substrat.

Peut-être cette remarque justifie-t-elle l'addition d'EDTA au milieu de dosage comme le conseillent

AUDIFFREN et coll. (6) et justifie-t-elle les taux de lysozymémie de 7 à 15 µg/ml trouvés par ZUCKER (116). LOWE et coll. (72) proposent un substrat soluble de diholoside, le 4 β-aryl di N-acétylchitobioside ou de β-S phényl di N-acétyl thiochitobioside.

CHARLEMAGNE et JOLLÈS (22) hydrolysent partiellement de la chitine pour obtenir des tétra et penta N-acétylglucosamines hydrosolubles, tandis que HARA et coll. (46) traitant de la chitine par de l'oxyde d'éthylène réalisent un glycolchitine qu'ils acétylent. Pour ces auteurs, la taille des N-acyl-glucosamines est capitale pour l'activité muramidasique.

En 1968, YAMASAKI et coll. (115) restent encore fidèles au substrat glycol-chitine utilisé à pH = 5, 6, tandis que PISZKIEWICZ et coll. (95) recommandent un diholoside de o. carboxyphénylacétamido glucopyranoside et LOWE (72), imitant OSAWA, revient à un substrat paranitrophénylé.

IMOTO (51) utilise une carboxyméthylchitine et il appelle "véritable substrat" le N-acétylglucosamine tétrasaccharide probablement identique au chitotétraose de KRAVCHENKO.

Qu'il s'agisse de di, tri ou tétraholosides de la chitine, acétylés ou non, toutes ces tentatives démontrent le désir des analystes de substituer un dosage plus spécifique qu'à une simple mesure turbidimétrique, à celle d'un réducteur quelconque ou à la mesure du diamètre d'un halo d'antibiose. L'obtention d'un substrat synthétique hydrosoluble chimiquement défini comme le B. A. E. E., reproductible, et d'un prix raisonnable, reste l'objectif essentiel.

Il ne paraît pas, en 1971, que l'unanimité soit réalisée sur l'abandon du vieux substrat de FLEMING.

Le choix du substrat spécifique muramidasique n'est pas encore arrêté, et le dosage du lysozyme reste encore à l'ordre du jour des programmes de la F. I. P.

Quant à l'appellation de "muramidase" elle n'est pas entièrement adoptée par tous, puisque les tomes de 1969 et les suivants de COLOWICK et KAPLAN reviennent à l'appellation de LYSOZYME.

II

TRAVAUX ANTERIEURS CONCERNANT NOS RECHERCHES

*

Avant de présenter nos recherches et résultats personnels, nous rappellerons les principaux travaux antérieurs concernant :

1°- Les différents dosages du lysozyme.
2°- La sensibilité aux agents d'oxydation.
3°- La thermostabilité du lysozyme.
4°- La dialyse et l'antigénicité de l'enzyme.
5°- Les lysozymes autres que ceux du blanc d'œuf.

*

1°/ TRAVAUX ANTERIEURS SUR LES DOSAGES DU LYSOZYME.

En 1966, KAGRAMANOVA et ERMOL'EVA (66) ont présenté une étude critique comparée des diverses méthodes de détermination de l'activité lysozymasique. Leurs conclusions ne semblent pas avoir influencé les travaux du colloque également de 1966 consacré au lysozyme, probablement parce que trop contemporains.

Il semble logique de classer ces dosages en deux groupes :

1°- Ceux utilisant le substrat naturel de FLEMING :

- par méthode turbidimétrique,
- par méthode réductimétrique,

- par mesure de viscosité,
- par diffusimétrie,
- par colorimétrie,
- par voie immunologique.

2°- Ceux essayant la mise en évidence d'une action amidasique spécifique.

Nous rappellerons les travaux antérieurs concernant ces méthodes de dosage du lysozyme.

A/ METHODES UTILISANT LE SUBSTRAT NATUREL DE FLEMING.

a/ Méthode turbidimétrique.

Près d'un demi-siècle après la mise en évidence de la protéine lysante par FLEMING, c'est le substrat qu'il a recommandé en 1922 qui est adopté par le plus grand nombre d'analystes :

- soit les germes vivants de M. lysodeikticus,
- soit les germes tués par irradiation ultraviolette et livrés sous forme d'une poudre sèche de germes réactifs.

La technique utilisant les germes vivants est décrite par SHUGAR (100) et c'est elle qui sert de référence à la plupart des maisons anglo-saxonnes préparant du lysozyme.

La suspension de germes, initialement en tampon phosphates $\frac{M}{15}$ pH = 7, 1, est filtrée sur laine de verre et amenée à une D. O. de départ de 0, 5 à 0, 75 en cuve de 10 mm d'épaisseur.

A la température de 25°C et à 450 nm, la diminution de la D. O. est lue toutes les 30 secondes pendant un temps inférieur à 4, 5 mn , les concentrations en lysozyme pour ce substrat frais sont de 6, 6 à 16, 5 µg par ml de solution d'enzyme. Pour obtenir la linéarité des courbes de dosage, SHUGAR dilue les solutions de lysozyme jusqu'à 0, 62 µg par ml.

Ultérieurement, l'optimum de pH a été ramené à 6, 24 et en 1970, l'unité "SHUGAR" est définie comme suit : "quantité d'enzyme nécessaire pour produire une diminution de 0, 001 de D. O., de suspension de M. lysodeikticus par minute à 450 nm, à 25° C et à pH = 6, 24".

N. B. Les industriels allemands ajoutent "unités SHUGAR" et renvoient à la référence de 1952 de cet auteur.

SMOLELIS et HARTSELL (102) utilisent un substrat de germes tués par irradiation ultra-violette mais ne se servent pas de ce substrat pour définir l'unité lysozymasique. Ils se contentent, comme JOLLÈS d'ailleurs, de comparer les courbes de lyse de préparations étalon ou inconnues pendant 20 minutes d'incubation à température ambiante.
JOLLÈS et coll. (61) en 1965 utilisent également la turbidimétrie pour doser l'enzyme. Leur substrat est encore M. lysodeikticus mais sous forme de poudre acétonique qui sera employée en tampon phosphates $\frac{M}{15}$ de pH = 6, 2. additionné de 10 p. 100 de son volume de Na Cl à 1 p. 100 de telle sorte que la D. O. de départ soit d'environ 0, 7 . On lit l'augmentation de la transmission à 650 nm et à 20°C. Ces auteurs déterminent le temps nécessaire pour avoir une augmentation de transmission de 40 p. 100.

Ce temps (T_{40}) conduit à une activité a, de telle sorte que

$$a = \frac{1}{t_{40}} \times 10^5$$

ce qui a permis à JOLLÈS de définir une unité :"temps en secondes pour obtenir un accroissement de 40 p. 100 de transmission à 25° C et à 650 nm".
Pour des temps de 0, 5 à 3 mn, il y a proportionnalité entre les temps lus et la concentration en lysozyme.

Cette activité est comparée à celle fournie par un étalon cristallisé de lysozyme de blanc d'œuf de poule d'ARMOUR et rapportée à l'unité de protéine étalon d'après le rapport des intensités des colorations fournies par l'étalon et l'inconnu traités par le réactif de FOLIN et CIOCALTEU.

Dans leur même communication, ces auteurs recommandent également, pour les microdosages, la poudre de DIFCO, substrat de M. lysodeikticus tués aux U. V., à 37°C, tampon phosphates $\frac{M}{15}$ de pH = 6, 2, lecture à 540 nm au lieu de 650 nm et pendant 35 mn au lieu des 2 mn de SHUGAR. Il ne peut être question ici aussi que de dosages comparatifs entre inconnus et étalon.

b/ Le dosage du lysozyme par réductimétrie.

La lyse mucopolysaccharidique des parois des germes de microbes utilisés comme réactifs est le procédé le plus simple et le plus aisément accessible. Cette lyse fait apparaître des subtances réductrices qu'on peut doser en exprimant les résultats en glucose.

COLOBERT et DIRHEIMER (24, puis 25), en 1962, lui ont donné la préférence sur les autres méthodes, la viscosimétrique notamment. Ils utilisent un dosage réductimétrique au ferricyanure, réalisé sur le produit de l'action hydrolasique du lysozyme sur le substrat soluble de SCHUTTE et KRISCH (97) et purifié selon DIRHEIMER (29).

Ces auteurs ont proposé également une unité d'activité hydrolasique, "quantité d'enzyme libérant par minute à 37°C et à pH = 5, 3, en phosphates 0, 05 M, NaCl 0, 0625 M dans des conditions expérimentales précisées, 0, 01 micromole de glucose".

c/ Méthode viscosimétrique.

En 1946, MEYER et HAHNEL (77) reprenant des travaux publiés dix ans auparavant (79) (80) ont montré que la méthode turbidimétrique utilisée depuis la découverte de FLEMING n'était pas exempte de critiques par suite de la présence d'enzymes contenues dans les parois bactériennes de M. lysodeikticus ou de certaines souches de Sarcina lutea et de la difficulté du broyage des germes même par la méthode des ultrasons.
Aussi proposent-ils une méthode basée sur la diminution de la viscosité sous l'effet de la lyse.

- La viscosité est mesurée à 37°C dans un viscosimètre d'OSTWALD étalonné par rapport à du soluté

à 9 p. 1000 de NaCl donnant 66 secondes entre les traits du viscosimètre. Les auteurs définissent "leur unité viscosimétrique" comme "la quantité d'enzyme donnant la moitié de la viscosité en 10 minutes".

Ainsi, le lysozyme cristallisé renferme 1 unité de viscosité dans 0, 73 µg de produit.

En dehors de cet essai de définition d'unité enzymatique, le travail démontre que l'activité du lysozyme est maximum de pH = 4, 0 à pH = 7, 0 et que le maximum de libération de substances réductrices à partir de ce substrat est à pH = 5, 0.

C'est en étudiant des fractions de la combinaison réductrice papaïne-HCN que MEYER et HAHNEL constatèrent que les mucopolysaccharides de M. lysodeikticus devenaient plus fluides en même temps qu'apparaissait de l'acétylhexosamine. Le même résultat fut obtenu avec des préparations de Ficus, aussi bien à l'aide de germes vivants, en pleine croissance, des souches susnommées entre 24 et 48 h. de pousse, qu'avec la poudre de germes tués par l'acétone glacée pendant 24 h. à 0°.

L'intérêt de ce travail réside dans le fractionnement du substrat par l'éthanol et une précipitation par l'hydrate de zinc de telle sorte que 10 g de poudre sèche acétonique de germes ne donnent que 1, 5 à 2 p. 100 de mucopolysaccharides hydrolysables par le lysozyme.

Par fractionnements de Sarcina lutea, de S. aureus et de M. lysodeikticus, on obtient des substrats attaqués de façon fort variable par l'enzyme. Ce qu'il faut retenir ici est que le mucopolysaccharide de MEYER et HAHNEL contient de 5, 5 à 6, 5 p. 100 d'azote et 23 à 30 p. 100 d'HEXOSAMINE, constatation que fera COLOBERT (23). Le produit de l'hydrolyse est plus intensément coloré dans la réaction d'ELSON et MORGAN avec acétylacétone (hexosamine) que sans cette addition (acétylhexosamine).

A la concentration de ce substrat fractionné (5 mg par ml) pour 0, 04 à 0, 1 mg/ml de lysozyme en 2 heures à 37°C, il apparaît 10 p. 100 du poids, exprimé en glucose et la moitié de cette valeur est de l'acétylglucosamine dosée selon MORGAN et ELSON (82).

Cependant, bien qu'ayant été utilisée par SCHUTTE et KRISCH (97) en 1958, cette technique viscosimétrique est trop sensible à la présence d'ions minéraux, comme en fournit NaCl, aussi suivant COLOBERT et DIRHEIMER (25) considérons-nous que "les modifications de viscosité ne peuvent absolument pas servir à mesurer l'activité enzymatique du lysozyme".

d/ Méthode diffusimétrique.

JACOB, JORRE, VIKRAL, PALOU et THELLIER (52) ont proposé, en 1964, l'utilisation d'une méthode diffusimétrique pour le dosage du lysozyme.

C'est une méthode d'antibiotique.

e/ Méthodes colorimétriques.

Nous ne ferons que signaler ici les méthodes colorimétriques les plus diverses qui ont été proposées; les unes inspirées du dosage de la tyrosine libérée par l'enzyme, comme pour la méthode classique d'ANSON à l'hémoglobine ou à la caséine, les autres basées sur l'utilisation d'un substrat para nitrophénylé cité par OSAWA (90) en 1966 et conseillé par LOWE et coll. (72) en 1968, mais sur un substrat "dérivé" du M. lysodeikticus. Celles enfin basées sur la coloration d'ELSON et MORGAN seront détaillées ci-après.

f/ Méthodes immunologiques.

GONÇALVES en 1956 (42) a le premier étudié les propriétés immunochimiques de lysozymes cristallisés, 6 et 8 fois.

Il constate l'homogénéité de la protéine par chromatographie mais signale l'apparition d'altération au cours du vieillissement des préparations.

BARBU et RAMPINI (12), puis GLYNN (41) en 1966, ont eux aussi utilisé les réactions immunologiques pour l'étude des lysozymes.

La même année également, ALLERHAND et coll. (4) utilisent à la fois la technique d'OUCHTERLONY et celle d'immuno-électrophorèse pour des dosages spécifiques d'enzymes diverses dont le lysozyme.

Cette technique est certainement pleine d'avenir en raison de sa spécificité et de sa sensibilité, en tenant compte des rapports antigène-anticorps pour éliminer un phénomène de zone possible.

B/ METHODES TENDANT A METTRE EN EVIDENCE L'ACTIVITE MURAMIDASIQUE SPECIFIQUE.

Comme nous l'avons relevé précédemment pour les travaux tendant à substituer l'appellation de MURAMIDASE à celle de LYSOZYME, le choix du substrat est variable selon les divers chercheurs, et actuellement, on ne peut parler de DOSAGE muramidasique du lysozyme.

Nous rappellerons simplement les recherches de REISSIG, STROMINGER et LELOIR (96) tendant à préciser les conditions optimales d'apparition des réactions des amino sucres d'ELSON et MORGAN. DIRHEIMER (29) pour sa part, a donné la composition en hexosamines de son substrat hydrosoluble extrait des parois de M. lysodeikticus pendant 16 heures à 100°.

WIJS et JOLLÈS (111) ont montré également la lenteur de l'hydrolyse muramidasique. Nous y reviendront dans nos travaux personnels.

2°/ TRAVAUX ANTERIEURS SUR LA SENSIBILITE DU LYSOZYME VIS-A-VIS DES AGENTS D'OXYDATION.

Nous n'envisagerons ici que les travaux antérieurs de sensibilité de l'enzyme à l'iode et aux radiations.
L'action de l'iode a été signalée par FRAENKEL-CONRAT en 1950 (36), puis en 1964, par HARTDEGEN et RUPLEY (47).

Les conditions de l'inactivation progressive de l'enzyme par l'halogène sont décrites et portent sur la formation d'un résidu d'iodo-histidine instable pour le premier auteur, par celle d'un dérivé iodé du tryptophane pour les seconds.

En 1952, SHUGAR (100) a étudié l'inactivation par l'irradiation ultraviolette, reprenant un travail qu'il avait publié l'année précédente sur la photosensibilisation des enzymes.

L'intérêt de ce travail réside dans la photo - sensibilisation aussi bien par les radiations visibles que par les ultraviolets.

JAVILLIER et coll. (53) rappellent quels sont les amino-acides du lysozyme affectés par l'oxydation.

Pour 2 moles d'O_2 absorbées, le pourcentage d'inactivation est de 70 p. 100 , concernant l'histidine et une partie du tryptophane. Pour 6 moles d'O_2 absorbées, l'inactivation atteint 100 p. 100 et touche l'histidine, une proportion plus importante du tryptophane que dans l'oxydation par 2 moles, le sixième des moles de tyrosine.

Cette forte oxydation s'éloigne toutefois des conditions de conservation des préparations pharmaceutiques du lysozyme. On ne doit pas cependant en ignorer le risque.

3°/ TRAVAUX ANTERIEURS CONCERNANT LA STABILITE THERMIQUE DU LYSOZYME.

Dès sa découverte en 1922, FLEMING (34) démontra que le lysozyme devenait inactif après 30 mn de chauffage à 75°C.

En 1936, MEYER, THOMPSON, PALMER et KHORAZO (80), puis ABRAHAM (1) en 1939, ont signalé la thermostabilité du lysozyme en milieu acide à 100°C. Ce dernier auteur a constaté la thermolabilité aux pH alcalins.

Il a, d'autre part, signalé la stabilisation de l'enzyme vis-à-vis de l'inactivation thermique par addition du cation Mn^{2+}.

Cette addition de sels de manganèse sera retrouvée par ailleurs pour conserver l'activité de l'arginase.

SMOLELIS et HARTSELL (103), en 1952, ont trouvé une faible variation d'activité pour les températures de 25°C, 37°C et 52°C du moins pour des concentrations d'enzyme relativement fortes, de 1 : 200 000 première dilution du dosage.

L'écart est plus important pour ces mêmes températures aux dilutions extrêmes, de 1 : 1.600.000 , 1 : 3.200.000, 1 : 6. 400. 000 ; il atteint, puis dépasse 50 p. 100.

A noter que le facteur thermique entraine une activation de l'enzyme du moins dans cet écart thermique et précisons-le pour les fortes dilutions. A 65°C et à pH = 5, 0 l'enzyme résiste 1 heure.

SMOLELIS et HARTSELL (103) indiquent les résultats de leurs déterminations après chauffage de dilutions de lysozyme (10 µg/ml) à 80°, 100°, 121°, pendant les temps de 0 à 90 mn.

Il y a baisse des titres en fonction de la température mais il faut atteindre 121°C pour obtenir une inactivation totale.

En 1968, NIEMAN (85) a montré que la perte d'activité du lysozyme, 30 secondes à 100° et 1 minute à 100° était inférieure à 10 p. 100 en maintenant le pH entre 4 et 5.

JOLLÈS (58) précise que la stabilité de l'enzyme est telle qu'elle résiste à 100° pendant 3 mn à pH = 4, 5.

Dans le travail publié avec LEDIEU et ZUILI (64), il précise que les lysozymes de rates de lapin et de rates de chien sont stables à 100°, 3mn à pH = 4, 5 en solution.

Dans sa revue sur la chimie et la biochimie des lysozymes de 1966, JOLLÈS (60) fait de cette thermostabilité une propriété caractéristique et essentielle des lysozymes.

Nous verrons dans nos travaux personnels l'intérêt de cette propriété, en opposition apparente avec les acquisitions antérieures de NORTHROP et coll. (87).

4°/ TRAVAUX ANTERIEURS RELATIFS A LA DIALYSE ET A L'ANTIGENICITE DE L'ENZYME.

Les premières constatations de la dialyse de l'enzyme furent annoncées par FRAENKEL-CONRAT (36) puis par SHUGAR (100). Le premier rattacha cette propriété à la nature basique de l'enzyme, le second constata simplement le passage à travers des membranes de cellophane : le titre de l'enzyme passe de 1, 2 mg/ml à 0, 4 mg/ml après 3 jours à 20°C.

La dialyse du lysozyme à travers les parois des polynucléaires peut expliquer les variations physiopathologiques entre le lysozyme des leucocytes et celui du plasma sanguin relevées par ORFILA et RAMPINI (89).

Peu de travaux ont été communiqués semble-t-il sur l'antigénicité de la molécule protéique qu'est le lysozyme du moins sur le plan expérimental.

En 1956, GONÇALVES et coll. (42) ont montré par des chromatographies et par des études immunochimiques, les possibilités d'altération du lysozyme.

Ils opèrent cependant avec des lysozymes recristallisés 6 et même 8 fois. Ils ne font pas allusion à l'antigénicité.

HANNOUZ (45) en 1965 a présenté une communication sur l'antigénicité et la pureté d'une préparation de lysozyme.

Il a constaté par des chromatographies sur papier combien il était difficile d'affirmer la pureté des lysozymes commerciaux et la difficulté d'éliminer l'ovalbumine indésirable.

GLYNN (41) dans son exposé sur le rôle et la répartition du lysozyme intracellulaire et extracellulaire utilise des réactions de précipitations antigène-anticorps mais n'insiste pas spécialement sur le rôle antigénique du lysozyme.

Les constatations cliniques sont par contre souvent mentionnées.

5°/ TRAVAUX ANTERIEURS CONCERNANT LES LYSOZYMES AUTRES QUE CEUX DU BLANC D'ŒUF DE POULE.

Les lysozymes sont répandus aussi bien dans le règne animal que dans le règne végétal.

Il est utile de résumer les acquisitions quantitatives des diverses sources étudiées, du moins les ordres de grandeur, car les techniques de détermination ont été très variables.

1°- Lysozymes d'origine animale.

a/ Lysozymes humains :

- Leucocytes 10 g/kg ± 30 p. 100 (poids sec)
- Larmes 7 g/kg ± 20 p. 100
- Larmes 0,5 à 2 g/litre (BONAVIDA et coll. (15))
- Colostrum 100 à 400 mg/litre
- Cartilage 200 mg/kg
- Salive 150 à 200 mg/kg (BALEKJIAN et coll. (10))
- Lait 40 à 500 mg/kg

- Rate 20 à 40 mg/kg
- Placenta 15 à 20 mg/kg.

Les urines des deux sexes ne contiennent pas ou très peu de lysozyme . Il y en a beaucoup dans les polynucléaires de certains leucémiques.

b/ Lysozymes animaux.

- Blanc d'œuf de poule 4 à 5 g/kg ± 20 p. 100
- Blanc d'œuf d'oie 1,2 g/kg ± 20 p. 100
- Blanc d'œuf de cane 0,8 à 1,5g/kg
- Rate de lapin 0,4 g/kg

2°- Lysozymes d'origine végétale.

FAUST et THOMEN (33) en 1941 mirent en évidence les propriétés parasiticides de la ficine, mais ce furent MEYER, HAHNEL et STEINBERG (78) en 1946, qui démontrèrent,les premiers, l'existence du lysozyme dans le latex des papayers, puis dans ceux de Ficus divers.

Par la méthode viscosimétrique que nous avons vue précédemment, ils mirent en évidence, après 1 heure d'incubation à pH = 7 et à 37°C, une activité mucopolysaccharidasique sur substrat de M. lysodeikticus.

Les préparations obtenues à partir du suc de papayer donnaient un lysozyme moins actif que celui d'œuf de poule.

Alors que ce dernier hydrolyse 10 p. 100 de mucopolysaccharides en 2 heures à 37°, le suc de papayer n'en libèrerait que 3, 8 p. 100 et après 23 heures, soit une activité 30 fois plus faible.

Ces auteurs ont donc essayé la concentration de la fraction lysozymasique. Ils ont utilisé les techniques de purification préconisées dès 1935 par GRASS - MANN (44) à l'aide d'adsorptions sélectives et de précipitations méthanoliques.

Toujours avec leur méthode viscosimétrique, MEYER et coll. sont arrivés aux résultats suivants :

	Teneur en lysozyme
- Papaïne adsorbée sur bentonite	1, 9 unités viscosimétriques au mg.
- Papaïne préparée selon FRUTON	4, 0 " "
- Papaïne adsorbée sur $Pb(OH)_2$ et $Al(OH)_3$	5, 0 " "
- Papaïne précipitée par CH_3OH (GRASSMANN)	6, 5 " "

Le fractionnement par les alcools conduit donc - par les mesures viscosimétriques - aux meilleurs résultats.

HOWARD et GLAZER (49), en 1969, ont abouti à des conclusions différentes.

Pour la ficine, les fractions obtenues par adsorption sur alumine auraient donné des lysozymes au moins aussi actifs que ceux du blanc d'œuf.

GLAZER et coll. (40), en 1969, ont trouvé que le lysozyme de Ficus donnait une activité égale à 85 p. 100 de celle du lysozyme du blanc d'œuf de poule.

Enfin, en 1961, SKUKLA et coll. (101) ont publié que sur 15 latex d'Artocarpus de l'Inde, 8 contiennent des lysozymes.

3°- Lysozymes extraits de leucocytes.

JOLLÈS, PETIT, CHARLEMAGNE et JOLLÈS (65), en 1964, ont réussi à extraire 4 lysozymes d'origine humaine, mais nous mentionnerons essentiellement le travail de CHARLEMAGNE et JOLLÈS (21) sur les lysozymes des leucocytes et du plasma humains. Ces auteurs ont extrait le lysozyme des leucocytes de sujets sains et de malades atteints de formes diverses de leucémies. Les résultats de ces auteurs ont été repris ultérieurement en 1968, par NIEMANN (85), dans son étude comparée des lysozymes. NIEMANN traite les leucocytes par CH_3COOH 0, 1 N, à pH = 3, 5, 1 mn à 100°C.

III

COMPOSITION ET PRINCIPALES PROPRIETES BIOCHIMIQUES DU LYSOZYME

*

Il n'est pas inutile de rappeler les acquisitions concernant la structure de la protéine enzymatique qu'est le lysozyme.

C'est le mérite de l'Ecole Française du Pr. JOLLÈS d'avoir établi la formule développée et la masse moléculaire de cet édifice peptidique.

Au colloque de 1966, sur les lysozymes, JOLLÈS (60) a rappelé l'ensemble de ses travaux basés sur l'étude des hydrolysats trypsiques, chymotrypsiques et pepsiques de lysozymes d'origines diverses afin d'en établir la structure complète.

Partant de lysozymes divers chromatographiés sur Amberlite CG 50, il a d'abord réalisé l'hydrolyse totale prolongée en tube scellé par HCl 6 N et à 110°C pendant plusieurs jours pour libérer tous les amino-acides contenus dans la molécule.

Dans un second stade, il a réalisé des hydrolyses trypsiques suivies de chromatographies sur DOWEX 50 x 2 et sur DOWEX 1 x 2 pour l'enzyme réduit.

Cette molécule réduite est soumise à son tour à une hydrolyse chymotrypsique.

Pour les peptides contenant de la cystine, il faut recourir à une hydrolyse pepsique de 24 heures, à 28° C et à pH = 1, 95.

Avec ces fractionnements, à l'aide des enzymes protéolytiques, JOLLÈS a obtenu 18 fractions

trypsiques dont chacune peut contenir un seul amino-acide – comme l'arginine ou la lysine – des di et des polypeptides dont le plus complexe renferme à lui seul 17 amino-acides différents.

La chymotrypsine conduit à 26 fractions au total, mais avec des amino-acides libres ou à enchaînement polypeptidique différent.

Ces travaux ont permis à JOLLÈS de reconstituer entièrement l'édifice de la molécule de l'enzyme. Celle-ci se compose de 129 amino-acides repliés en une chaîne comportant 4 points de liaison par ponts disulfures de 8 moles de cystéine. Ces ponts assurent une relative stabilité spatiale confirmant les résultats de BROWN (18) de 1964 et l'ébauche de la chaîne spiralée selon BRAGG proposée par JOHNSON (57). Une extrémité de la chaîne est constituée par de la lysine, l'autre par de la leucine.
CANFIELD (19), CANFIELD et ANFINSEN (20) en 1963, avaient eux aussi reconstitué le lysozyme par l'étude des mêmes hydrolysats trypsiques, chymotrypsiques et pepsiques.

Chaque polypeptide isolé est biologiquement inactif et cependant, à l'aide d'une aminopeptidase de moisissures, à pH = 7, 5 et à 37°C, on peut "raccourcir" la chaîne du lysozyme de 129 à 126 amino-acides par départ de lysylvalyl-phénylalanine. Ce lysozyme reste encore biologiquement actif.

Cette constatation peut justifier partiellement les taux d'azote total différents des lysozymes cristallisés : la lysine contient 19, 16 p. 100 et la valine 11, 9 p. 100 d'azote total.

Cependant, entre le lysozyme étalon d'ARMOUR à 16, 7 p. 100, cité par JOLLÈS (59) et celui de SHUGAR (100) titrant 18, 6 p. 100, l'écart est considérable. Il ne peut s'expliquer que par une teneur en amino-acides variable selon les lysozymes analysés ou de purifications incomplètes.

La masse moléculaire du lysozyme du blanc d'œuf de poule a successivement été trouvée :

en 1952	de	14 700	SHUGAR
en 1960	de	14 600 ± 200	JOLLÈS (in BOYER, LARDY, MYRBÄCK) (17)
en 1964	de	17 000	DIXON et WEBB
en 1964	de	14 750	JAVILLIER (49)
	de	14 400	I. U. B.
en 1966	de	14 386	JOLLÈS (Colloque sur les lysozymes)
N. Ben 1962	de	15 000	Lysozymes de rates (P. JOLLÈS, in COLOWICK, KAPLAN)

Le point isoélectrique selon les divers blancs d'œufs se situe de pH = 9, 5 à pH = 11.

GAJDOS (37), en 1971, a précisé le mécanisme moléculaire de l'action enzymatique. La structure spatiale du site actif du lysozyme impose en effet à la molécule du substrat une distorsion, créant le point vulnérable où sera localisée l'hydrolyse enzymatique.

L'état cristallin du lysozyme a pu être confirmé par l'étude des diagrammes aux rayons X, en 1952 par COREY (27), puis en 1954, par KING (67).

Les principales propriétés biochimiques du lysozyme ont été détaillées en 1969 par DUBOIS-PREVOST (31).

Rappelons, pour terminer, la nomenclature internationale du lysozyme :

3 . 2 . 1 . 17

ce qui signifie :

3 : classé dans les hydrolases,

2 : sub-classe des enzymes agissant sur les composés glycosylés,

1 : sub-sub-classe glycoside hydrolase,

17 : numéro de l'enzyme dans la série sub-sub-classe.

IV

PREPARATIONS DU LYSOZYME A USAGE MEDICINAL

*

a/ Procédé par précipitation.

Le procédé industriel décrit ci-après dérive de celui d'ALDERTON et FEVOLD (2). Il est détaillé par PEREZ (92).

Les blancs d'œufs de poule sont privés de chalazions par filtration sur gaze — petites quantités — sur filtre toile pour plus grosses quantités. On ajoute au volume de blancs 5 p. 100 en poids de NaCl, on ajuste à pH = 9, 5 à l'aide de lessive de soude pure en homogénéisant bien la masse maintenue à + 2°C ~ + 4°C et on laisse précipiter l'enzyme pendant 8 jours dans des cuves refroidies en agitant une ou deux fois par 24 heures .

Le précipité de lysozyme base est centrifugé ou recueilli sur filtre presse. Il est redissout dans HCl concentré de façon à ramener le pH à 4, 5.

Le liquide est centrifugé pour éliminer les protéines étrangères et réajusté à 9, 5 à nouveau avec de la soude. Toujours à moins de + 4°C, on ajoute à nouveau après titrage des chlorures par méthode de MOHR, NaCl jusqu'à concentration de 5 p. 100 en poids, et on laisse précipiter une deuxième fois le lysozyme base à pH = 9, 5.

Si l'on veut utiliser le lysozyme base, pour la voie orale, il suffira de recueillir ce précipité, de le laver avec un faible volume d'eau glacée, de le filtrer à la presse et de le lyophiliser comme le conseille PEREZ. On obtient alors le lysozyme pur amorphe isoélectrique.

Si on désire préparer du chlorhydrate de lysozyme, il suffit de ramener à pH = 4, 5 par HCl, de réajuster la concentration en Na Cl total à 5 p. 100 et de laisser à + 2° + 4°C précipiter pendant 4 à 5 jours.

A ce stade, le chlorhydrate de lysozyme est rarement cristallisé. Il faudra recommencer 3 à 4 fois le passage à pH = 9, 5 et retour à pH = 4, 5 pour obtenir le chlorhydrate cristallisé, opération onéreuse par le temps d'immobilisation des cuves de sédimentation, la consommation de frigories pour un résultat qui ne conduit pas forcément à un produit dépourvu de protéine initiale du blanc d'œuf.

Une dialyse permet d'éliminer la totalité de NaCl pour l'obtention de chlorhydrate de lysozyme destiné à l'usage scientifique.

Les rendements sont faibles :

2, 5 à 3 p. 1000 en lysozyme base,
1 à 1, 5 p. 1000 en chlorhydrate de lysozyme,
moins de 0, 5 p. 1000 en chlorhydrate cristallisé.

Il existe des chlorhydrates de lysozyme commerciaux obtenus après 1, 2 ou 3 cristallisations : les plus purs sont privés de Na Cl par dialyse.

b/ Procédé par adsorption.

Ce procédé a été initialement décrit par ALDERTON, WARD, FEVOLD (3), en 1945.

Il est encore conseillé par IKAN (50), dans son ouvrage de 1969 intitulé "Natural Products Laboratory guide".

La méthode par adsorption est plus rapide et n'immobilise pas les bacs de précipitation refroidis comme dans la méthode précédente.

Elle est réalisée au moyen de bentonite, d'argiles diverses, ou d'Amberlite acide I R C 50, sur un volume de blancs privés de chalazions.

On ajoute 25 g de bentonite en suspension dans KCl 0, 15 M par kg. de blancs d'œufs filtrés sur gaze

et agités en bassines en inox à 10° - 15° C pendant quelques heures.

L'adsorbat est alors centrifugé, le culot est lavé avec 5 fois son volume de tampon phosphate de K 0, 5 M à pH = 7, 5, 3 à 4 fois de suite puis une fois avec 5 fois son volume de pyridine aqueuse à 5 p. 100.

L'élution du lysozyme est réalisée sur colonne par de la pyridine à 5 p. 100 ajustée à pH = 5 à l'aide de H_2SO_4 concentré, 2 fois 100 ml d'éluant. Une dialyse de l'éluat contre de l'eau courante et enfin par de l'eau distillée permet l'élimination presque totale de l'odeur de pyridine. Le contenu du dialyseur est concentré à basse pression vers 50°C, puis lyophilisé.

Ce procédé est correct pour quelques kg. de blancs au plus. Il ne semble pas pouvoir être retenu à l'échelle industrielle, en raison de la difficulté d'éliminer toute trace de pyridine dans le produit final et du désagrément de la manipulation de cet éluant.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

*

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I

LES DOSAGES DU LYSOZYME

*

I - LE DOSAGE TURBIDIMETRIQUE DU LYSOZYME .

Avant d'exposer les principaux points que nous avons étudiés, nous allons différencier au départ les deux types d'expression des résultats concernant le dosage du lysozyme :

a- soit exprimés en unités d'activité enzymatique ,

b- soit exprimés en pourcentage par rapport à un étalon de chlorhydrate de lysozyme cristallisé .

A / DOSAGE TURBIDIMETRIQUE DU LYSOZYME.

EXPRESSION DES RESULTATS EN UNITES D'ACTIVITE ENZYMATIQUE .

Une unité internationale résultant du rapport de l'Union Internationale de Biochimie (ou I. U. B.) sera définie comme "la quantité d'enzyme nécessaire pour produire une transformation de 1 micromole de substrat par minute dans des conditions définies" .

Comme nous l'avons déjà dit, faute d'un substrat hydrosoluble et chimiquement défini, l'application de la recommandation de l' I. U. B. au substrat du lysozyme à savoir les diverses formes de M. lysodeikticus ne

permet pas pour le moment de définir une unité internationale convenable. C'est la raison qui fait que la majorité des industriels préparant du lysozyme expriment leurs résultats en "unités" dérivant pour la plupart du travail de SHUGAR de 1952. Une unité d'activité enzymatique de lysozyme est la "quantité d'enzyme nécessaire pour abaisser de 0,001 et par minute la densité optique d'une sus - pension de M. lysodeikticus, à pH = 6,24 et à 450 nm".

Cette unité laisse encore bien des points à préciser :

1°- l'optimum de la longueur d'onde est-il bien à 450 nm ?

2°- l'optimum du pH est-il 6,24 ?

3°- S'agit-il de germes frais vivants comme SHUGAR l'a proposé en 1952, ou d'une poudre acétonique de germes, ou bien de celle obtenue avec les germes tués par irradiation UV ?

4°- La température n'est pas précisée. Alors que l'I. U. B. recommande de fixer celle-ci à 25°C, il semble logique pour les applications thérapeutiques humaines de pratiquer les dosages à 37°C.

5°- La durée des lectures, fonction de la forme de la courbe de décroissance de la D. O. n'est pas précisée . Elle doit avoir lieu pour des temps correspondant à la partie linéaire de cette courbe afin d'obtenir des résultats transposables.

Ces points essentiels font l'objet de nos premières recherches.

Les conditions expérimentales retenues par quelques auteurs constituent le tableau de la page suivante.

TABLEAU DES CONDITIONS DU DOSAGE DU LYSOZYME PAR TURBIDIMETRIE d'après quelques auteurs

Auteur	*Expression en UNITES*				*Dosage par COMPARAISON*		
	Par diminution de D.O.			*Par mesure de temps*			
	SHUGAR (100)	*KOCH - LIGHT*	*MERCK*	*JOLLÈS (61)*	*SMOLELIS et HARTSELL (102)*	*JOLLÈS (61)*	*NIEMANN (95)*
longueur d'onde (nm)	450	450	450	650	540	540	540 à 700
pH	7,1	6,24	7,0	6,2	6,2 - 6,6	6,2	6,2
tampon phosphate	M/15		0,07 M	M/15	M/15	M/15	M/15
NaCl	0	0	0,017M	1 p. 1000	0	1 p. 1000	1 p. 1000
Température (°C)	20 env.	25	25	25	25	37	37
vol.de suspension	3 ml		3 ml	5 ml		3 ml	
vol. sol. enzyme	20à50µl		1 ml	0,5 ml		3 ml	
conc. en lysozyme	0,6 à 2,5 µg		5 µg	4 à 20 µg		0,1 à 1,2 µg	
état des germes	vivants		g. secs 0,2mg/ml	g. secs (acétone)	tués UV	tués UV	
D.O. de départ	0,5 à 0,75		0,8 envir.	0,7	1,0		
durée des lectures	fin de la 1er mn	par mn	3 mn	mesure du temps	20 mn	35	35

1°/ Choix de la longueur d'onde pour les dosages du lysozyme par turbidimétrie.

Pour une même suspension de germes de M. lysodeikticus, nous avons recherché s'il existait un optimum de longueur d'onde justifiant un choix en vue des dosages.

Nous avons utilisé les germes secs tués par irradiation U. V. de DIFCO 10 mg dans 100 ml de tampon phosphates $\frac{M}{15}$ + 1 p. 1000 de NaCl à pH = 6, 24 et à 37°C.

La lyse a été réalisée par 1 ml de chlorhydrate de lysozyme à 25 µg/ml pour 5 ml de tampon.

L'appareil choisi a été le spectrophotomètre UNICAM SP 500 avec cuves de 10 mm de traversée. Les lectures réalisées pendant 5 mn.

Les mesures ont été les suivantes :

TABLEAU n° I

D.O. x 100 de la suspension au départ		*D.O. x 100 durée de la lyse*				
	0	*1*	*2*	*3*	*4*	*5 mn*
λ = 400 nm	95	69	61	56	53	50
λ = 450 "	82	66	61	56	52	48
λ = 500 "	74	68	61	57	53	50
λ = 550 "	65	55	50	48	43	40
λ = 600 "	58	51	47	43	40	38

Les courbes du tableau n° I, page suivante, représentent ces résultats.

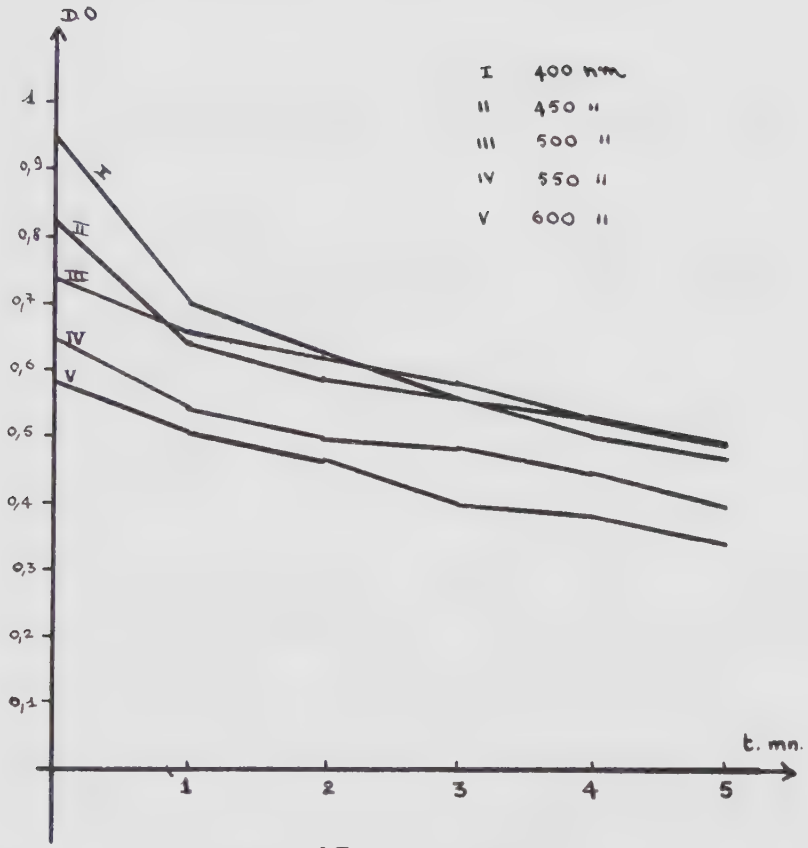


TABLEAU n° I COURBES n° 1

Variations des D.O selon les longueurs d'onde en fonction du temps des mesures

Comme il fallait s'y attendre, la variation de D. O. croît régulièrement vers les courtes longueurs d'onde. Il n'y a aucune discontinuité. On pourra donc choisir la radiation donnant les résultats les plus reproductibles pour un appareil déterminé. Au début, les premières mesures furent réalisées avec un néphélémètre de VERNES, BRICQ, CONSTANT, cellule au cesium avec écrans G = O, D = 1, soit une radiation de 700 nm.

Faute d'indication plus précise et pour la reproductibilité de nos travaux ultérieurs, nous opèrerons à 450 nm comme la majorité des auteurs chiffrant leurs résultats en unités d'activité lysozymasique.

Pour des longueurs d'onde inférieures, la transmission tend vers 0 quand on se rapproche de l'U.V.

Discussion :

Cette longueur d'onde est celle de SHUGAR (100) avec un spectrophotomètre de BECKMANN en travaillant sur germes vivants de M. lysodeikticus et pour des D. O. de départ de 0, 50 à 0, 75.

NIEMANN (85), en 1968, a laissé une marge importante dans le choix de cette longueur d'onde selon la sensibilité des appareils, la teneur en lysozyme et la durée des mesures.

Cet auteur a opéré à :

540 nm comme le recommande DIFCO et avec un appareil COLEMAN,
583 nm avec un appareil VITATRON,
650 nm avec un appareil de MEUNIER,
700 nm avec un appareil de BECKMANN.

Ce facteur est important pour chiffrer une activité lysozymasique en unités enzymatiques. Selon notre tableau, au bout d'une minute, notre même chlorhydrate de lysozyme titrerait :

12 000 unités à 400 nm,
5 000 unités à 600 nm.

Le choix de la longueur d'onde sera secondaire pour l'expression de l'activité en pourcentage par rapport à celle d'un étalon.

2°/ Optimum du pH dans les dosages par méthode turbidimétrique.

Avec une préparation standard cristallisée de chlorhydrate de lysozyme à 1 mg/ml et pour une D. O. de départ de 1 à 450 nm dans l'appareil UNICAM SP 500 en cuves de 10 mm, nous avons fait varier le pH du système tampon phosphates $\frac{M}{15}$ de 0, 25 unité pH.

Il s'agit de germes tués par les U. V. de DIFCO.

Pour les dilutions d'enzyme à 25 µg/ml, nous avons obtenu les résultats suivants, sur substrat de germes donnant une D. O. de départ égale à 1.

D. O. x 100

TABLEAU n° II

Temps	*0 mn*	*30sec*	*1 mn*	*1mn30*	*2 mn*	*2mn30*	*3 mn*
pH = 6,0	100	90,5	83	77	71,5	67	64
pH = 6,25	100	92	84,5	79	74	70	66
pH = 6,50	100	92,5	85	79,5	74,5	68,5	64
pH = 7,0	100	89	82	75	69	63	57
pH = 7,5	100	94,5	88	83	78	73,5	69

Des résultats du même type ont été déterminés à 540 nm.

D. O. x 100 TABLEAU n° III

Temps	*0 mn*	*30sec*	*1 mn*	*1mn30*	*2 mn*	*2mn30*	*3 mn*
pH = 6,0	100	97,5	90,4	85,6	81,3	77,5	74,5
pH = 6,25	100	95	86	82,5	77	73	70
pH = 6,50	100	96	90	85	80	75	71
pH = 7,0	100	89	85	78	73	69	64
pH = 7,50	100	96	88	84	77	73	70

Les tableaux II et III ci-dessus représentent les courbes correspondant à ces mesures (page 51).

Nous pouvons donc en déduire que dans les conditions précisées, l'optimum de la lyse mucopolysaccharidasique se situe au voisinage de 7, 0, au bout de la première minute.

Vu les faibles écarts des courbes, nous pouvons retenir pH = 7, 0 aussi bien pour les lectures à 450 nm visant à exprimer les résultats en unités d'activité enzymatique que pour celles effectuées à 540 nm pour les mesures par comparaison.

Discussion :

Les chiffres choisis aussi bien par les auteurs de notes scientifiques que par les fabricants sont assez divergents.

Les optimums de pH sont les suivants :

- SMOLELIS et HARTSELL (102), (103) 6, 6
- DIFCO 6, 2
- KOCH-LIGHT 6, 24
- MERCK 7,0
- SCHUCHARDT ..... non précisé
- SHUGAR (100) 7, 1
- WORTHINGTON 7, 0

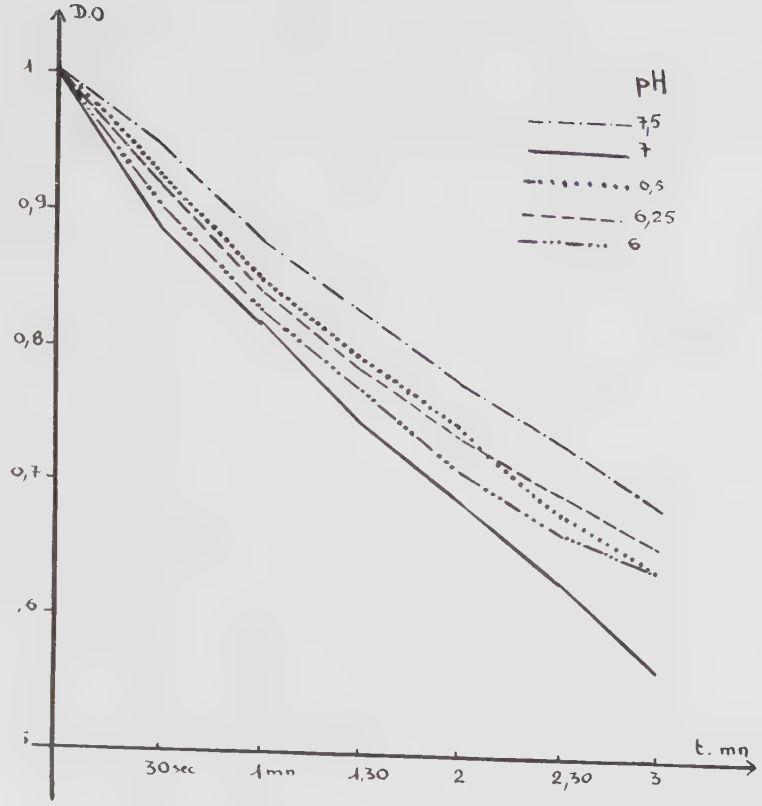


TABLEAU n° II COURBES n° 2

D.O selon les pH à 450 nm en fonction du temps

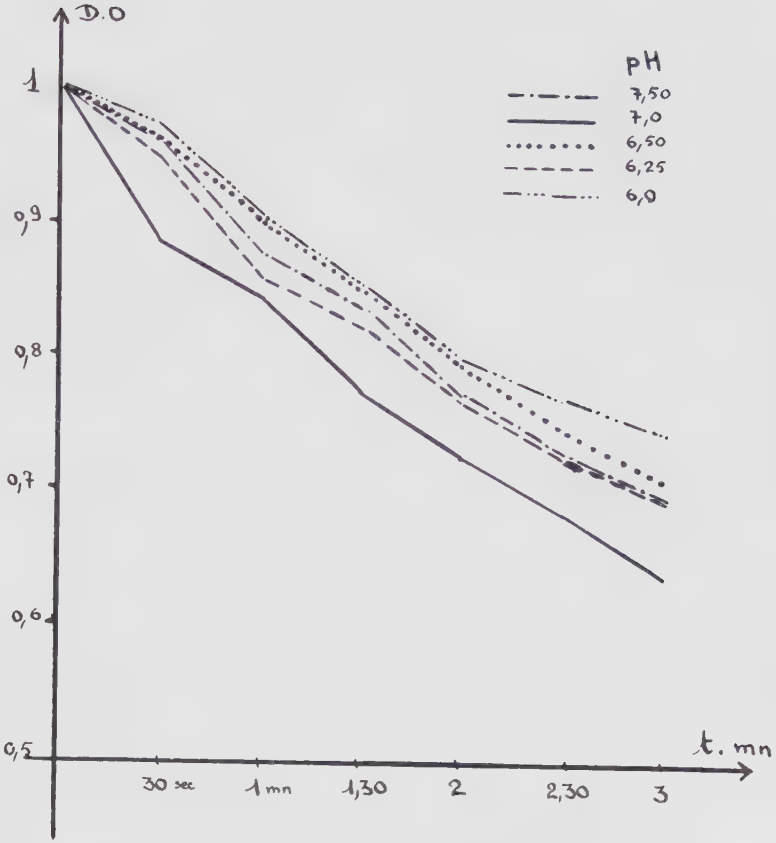


TABLEAU n° III COURBES n° 3

D.O selon les pH à 540 nm en fonction du temps

Ces chiffres démontrent la nécessité de la standardisation des méthodes turbidimétriques surtout si on désire exprimer les résultats en "unités enzymatiques" à 450 nm.

Pour les dosages comparatifs généralement pratiqués à 540 nm l'abaissement de la D. O. d'après nos courbes est le plus important autour de pH = 7, 0. Il sera donc logique de retenir pH = 7, 0 dans les deux cas.

3°/ Etat des germes de M. lysodeikticus retenus comme substrat du dosage turbidimétrique.

Choix entre germes frais vivants, poudres acétoniques ou poudres de germes tués par irradiation U. V.

Initialement la plupart des auteurs ont utilisé les germes vivants de souches de M. lysodeikticus, puis des germes tués par un antiseptique phénolique, une poudre de germes traités par l'acétone et desséchée.

Actuellement, la majorité des auteurs emploie la poudre de germes tués par irradiation ultraviolette recommandée par SMOLELIS et HARTSELL (102).

Nous avons essayé la méthode turbidimétrique à l'aide des trois substrats germes frais, germes acétoniques, germes tués aux U. V. et pour la longueur d'onde donnant les écarts de D. O. les plus importants. A 450 nm, on obtient les résultats indiqués page suivante.

Le titrage des quantités les plus faibles de lysozyme sera donc réalisé avec une suspension de germes vivants de préférence, pour doser de 0 à 5 µg/ml d'enzyme.

Pour les germes desséchés à l'acétone, la sensibilité est moindre ; pour les germes tués aux U. V. sensiblement du même ordre.

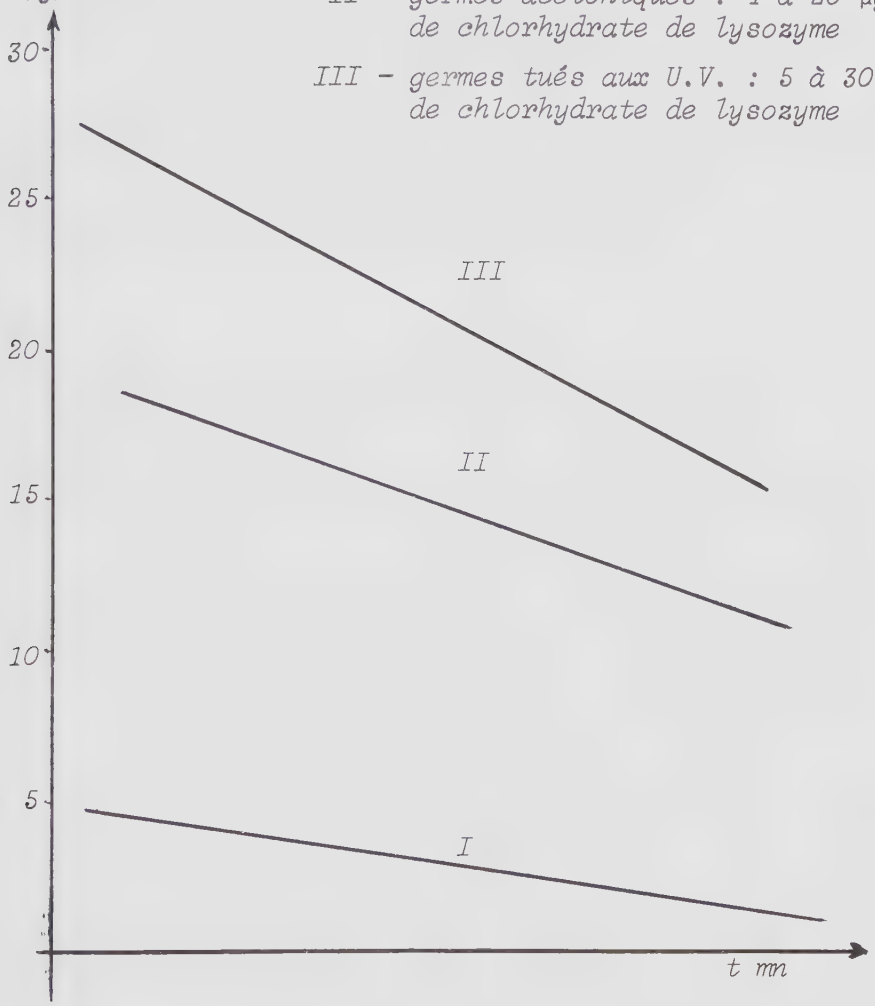
Avec cette méthode, on ne peut affirmer le chiffre le plus faible qu'à partir de 0, 5 µg/ml.

SHUGAR a donné 0, 62 µ g/ml comme premier chiffre valable.

I - germes vivants : 0,5 à 5 µg/ml de chlorhydrate de lysozyme cristallisé.

II - germes acétoniques : 4 à 20 µg/ml de chlorhydrate de lysozyme

III - germes tués aux U.V. : 5 à 30 µg/ml de chlorhydrate de lysozyme



COURBES n° IV - SENSIBILITE DU DOSAGE SELON L'ETAT DES GERMES DE M. lysodeikticus.

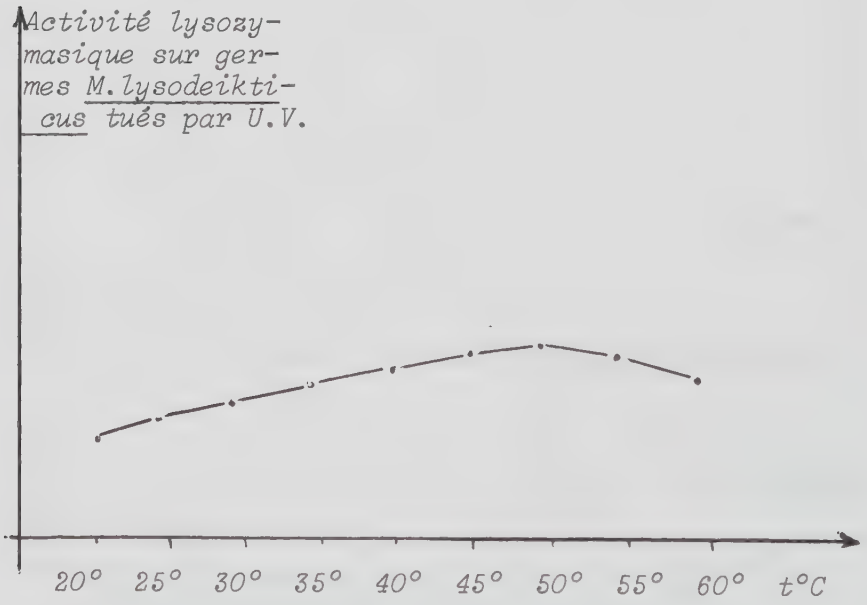
N.B. - Le temps des lectures est d'autant plus long que les concentrations de lysozyme à doser sont faibles.

N. B. - Le chiffre de 0, 15 µg/ml cité par SMOLELIS et HARTSELL semble difficilement accessible, et d'ail - leurs lu après 20 mn à la température ambiante. Pourtant, NIEMANN (85) a donné des teneurs aussi faibles , mais pour des lectures durant 35 mn à l'aide du spectrophotomètre de COLEMAN à 540 nm.

Plus les lectures sont prolongées, plus elles permettent d'atteindre de faibles concentrations de lysozyme.

4°/ Influence de la température sur la réaction enzymatique.

Les mesures ci-après concernent, tout autre paramètre constant , l'influence de la température sur la lyse mucopolysaccharidasique.



COURBE n° V - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA REACTION ENZYMATIQUE.

N. B. - Les D. O. du produit de l'hydrolyse sont diminuées des D. O. du substrat seul qui s'hydrolyse légèrement sous l'action de la température.

D'après la forme de la courbe, il ne paraît pas souhaitable de réaliser le dosage à température supérieure à 40° bien que la vitesse de l'action enzymatique soit accrue. En fixant notre choix à 37° nous adoptons les conditions de l'utilisation thérapeutique.

Discussion :

SHUGAR considère que la température est le "problème principal". Il précise qu'une variation de 0°2 C entraîne une variation de 3 p. 100 dans les résultats.

Cependant, tous ses dosages sont réalisés à température "de la pièce" soit 20°C.

La F. I. P. recommande 25°C pour les dosages d'enzymes ce qui ne peut être qu'une indication, fort variable selon les enzymes à doser. Le Codex a fixé 25° C pour la chymotrypsine et la trypsine,
37°C pour l'hyaluronidase.

Il nous paraît logique de retenir 37°C.

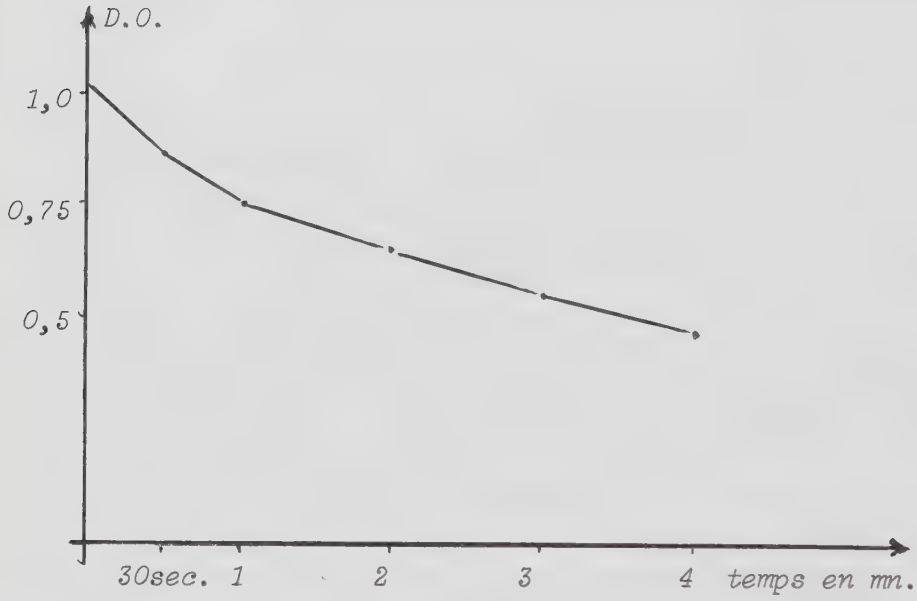
En 1968, NIEMANN (85) pour son microdosage, opère également à 37°C - en étuve -.

Il semble donc logique de retenir la température de 37°C avec thermostat à eau $\pm$ 0°1 C.

Il faut remarquer que les titres des enzymes commerciales baissent régulièrement. Compte tenu de la nécessité de les stocker au réfrigérateur, les industriels annoncent parfois des chiffres inférieurs en prévision de cet abaissement.

5°/ Durée des lectures pour l'expression des résultats.

La forme des courbes de titrage renseigne sur le temps à retenir pour l'expression des résultats en "unités" d'activité enzymatique.



COURBE n° VI - DUREE DES LECTURES POUR L'EXPRESSION DES RESULTATS.

La mesure des D. O. décroissantes de suspensions de germes tués aux U. V. a été réalisée avec plusieurs échantillons de chlorhydrate de lysozyme cristallisé.

Il faut que l'écart de D. O. par minute soit constant pour fixer la durée totale du dosage. Il ne semble pas utile de lire pendant plus de 3 minutes et on ne doit retenir que la partie linéaire de la courbe.

Nous proposons de retenir l'abaissement de la D. O. de la suspension au bout de la première minute, et il sera bon de pratiquer plusieurs dosages consécutifs pour faire la moyenne .

Discussion :

Ce facteur est celui qui conditionne essentiellement l'expression du résultat en "unités" d'activité enzymatique. La lyse mucopolysaccharidasique tend à décroître rapidement du fait de combinaisons probables entre l'enzyme et les produits de la dégradation du substrat.

Si on reprend les courbes publiées par SHUGAR et auxquelles se réfèrent la majorité des industriels, on ne doit retenir que les lectures réalisées pendant la première minute et non 4, 5 minutes.

D'autre part, si on compare les résultats présentés par cet auteur pour 6, 6 µg/ml et 16, 5 µg/ml de lysozyme, il faut reconnaître que les courbes sont très voisines pour des concentrations variant de 1 à 2, 5.

En opérant en 1 minute comme nous le proposons, les teneurs des meilleurs chlorhydrates de lysozyme que nous avons pu déterminer donnaient des chiffres de 10 000 à 12 000 unités au mg.

Il faut remarquer que les titres baissent régulièrement et que, compte-tenu du stockage à moins de + 5° C, l'expression en unités enzymatiques est plus logique que l'expression en pourcentage par rapport à un étalon qui n'aurait pas été conservé continuellement à température de réfrigérateur depuis sa préparation.

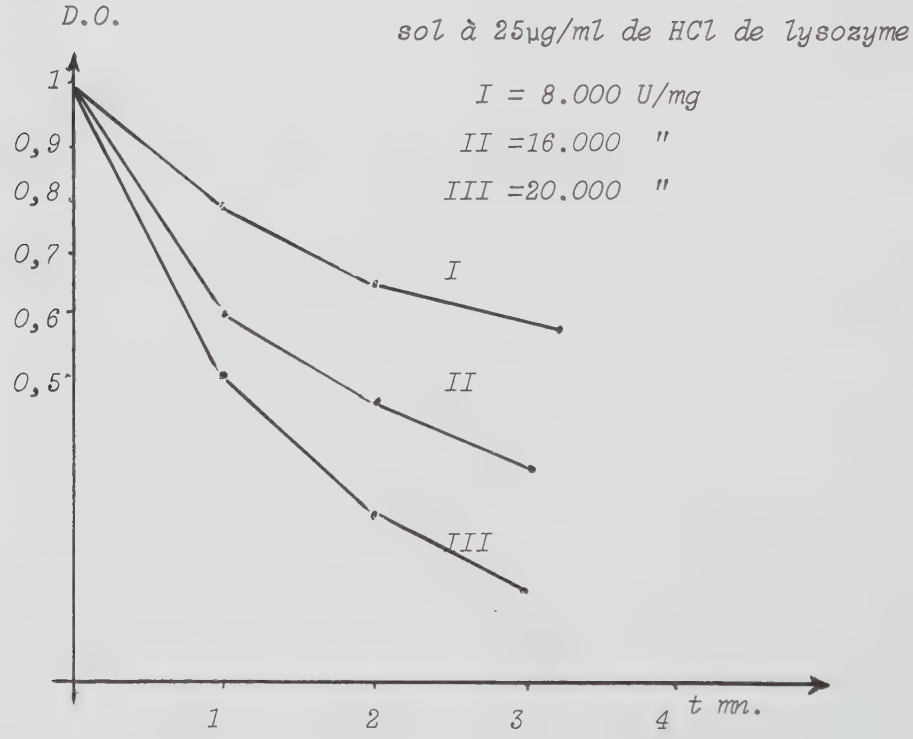
L'ensemble des résultats concernant chaque paramètre du dosage turbidimétrique, nous conduit à proposer une définition plus standardisée de l'unité d'activité lysozymasique :

"Quantité d'enzyme susceptible d'abaisser de 0, 001 à la fin de la première minute, la D. O. d'une suspension de D. O. = 1 au départ, de germes M. lysodeikticus tués par irradiation U. V., en tampon phosphates $\frac{M}{15}$ de pH = 7, 0 additionné de 1 p. 1000 de NaCl, à 450 nm, et à 37°C".

N. B. - Il ne s'agit pas, répétons-le, d'une unité internationale puisqu'il n'est évidemment pas question d'exprimer en fractions de moles la quantité de substrat transformé.

Il ne pourra s'agir d'unités internationales que lorsqu'un substrat hydrosoluble pourra être préparé régulièrement et en quantités suffisantes pour permettre l'analyse courante de médicaments à base ou contenant du lysozyme.

Exemples de résultats avec des solutions à 25 µg/ml lysozyme.



COURBES n° VII - VARIATION DES RESULTATS EXPRIMES EN "UNITES".

B/ DOSAGE TURBIDIMETRIQUE DU LYSOZYME PAR COMPARAISON AVEC UN ETALON.

Les différents paramètres que nous avons fixés ci-dessus peuvent être retenus pour les dosages comparatifs, à l'exclusion du facteur temps.

On comparera les courbes avec un étalon de chlorhydrate de lysozyme. La seule difficulté consistera à choisir le meilleur étalon possible. Actuellement, plusieurs firmes livrent du chlorhydrate de lysozyme de blanc d'œuf de poule cristallisé 3 fois et privé du NaCl de l'extraction par dialyse.

Le lysozyme d'ARMOUR, celui de SCHUCHARDT de N. B. C. (Nutritional Biochemical Comp.) peuvent servir d'étalon.

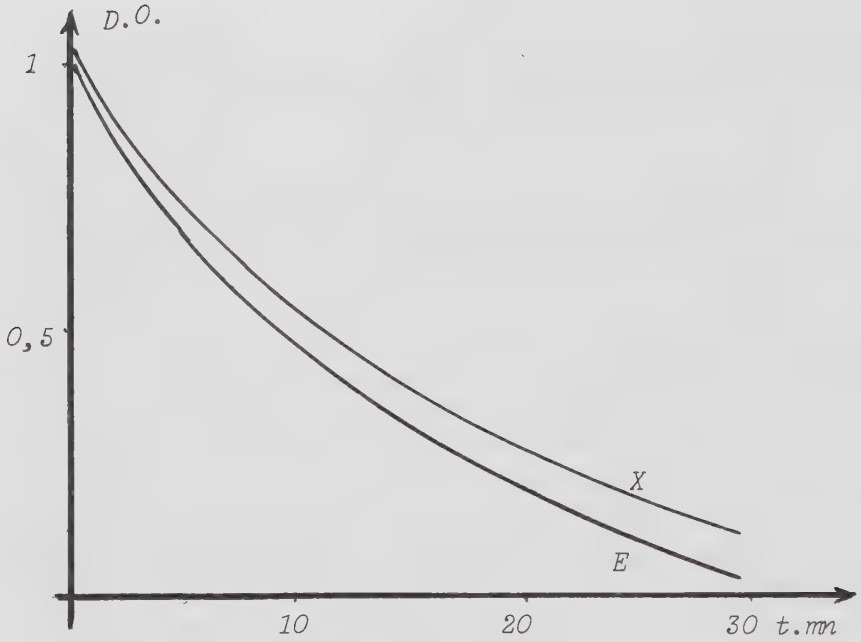
Il sera bon toutefois, avant de les utiliser, de s'assurer qu'ils sont chromatographiquement et électrophorétiquement purs ce qui n'est pas toujours le cas comme nous l'indiquerons dans le cinquième chapitre.

En possession d'un lysozyme étalon, de pureté suffisante, on pourra alors opérer les titrages sur germes de M. lysodeikticus tués aux U. V. également, à 540 nm, en tampon phosphates $\frac{M}{15}$ additionné de 1 p. 1000 de NaCl, et à 37°C.

C'est ce procédé qui est retenu par la majorité des laboratoires de l'Industrie pharmaceutique.

Il donne – comme pour de nombreux médicaments tels les antibiotiques dont les étalons primaires sont délivrés par l'O. M. S. ou le Laboratoire National de la Santé Publique en France – un résultat en pourcentage par rapport à un étalon.

Dans le cas où l'activité du lysozyme inconnu serait très différente de celle de l'étalon, il conviendrait de modifier la concentration de l'inconnu de telle sorte que les deux courbes soient très voisines. On tiendra compte des dilutions pour le résultat.



COURBES n° VIII - *DOSAGE D'UN LYSOZYME INCONNU X PAR RAPPORT A UN ETALON E DE CHLORHYDRATE DE LYSOZYME CRISTALLISE.*

Avec la méthode par comparaison, la durée des dosages et la température ont peu d'importance.

C'est avec elle qu'on peut atteindre les chiffres les plus faibles. DIFCO, par dilution selon SMOLELIS et HARTSELL atteint 0, 15 µg. C'est NIEMANN (85) qui donne les teneurs en lysozyme les plus faibles, par son microdosage au photomètre de BECKMANN, 0, 1 à 1, 2 µg de lysozyme après 35 mn de lyse à 37°C.

On voit ainsi l'importance du choix de la méthode et de l'expression des résultats, en unités enzymatiques pour des produits purs, pourcentage par rapport à un étalon pour les faibles teneurs.

La méthode turbidimétrique est sûrement la plus sensible, celle permettant d'atteindre les plus faibles concentrations en enzyme, confirmant un demi-siècle après , combien le choix fait par FLEMING était judicieux.

Il s'agit toutefois d'un résultat global mettant en jeu des actions enzymatiques complexes, dont la principale est l'action dépolymérasique des mucopolysaccharides des parois microbiennes.

II - DOSAGE DU LYSOZYME PAR REDUCTIMETRIE

L'action enzymatique du lysozyme libère des substances réductrices permettant des dosages faciles. Ils seront précieux dans l'analyse de mélanges médicamenteux.

Nous avons retenu une microréductimétrie par la méthode de FOLIN et WU se terminant par une colorimétrie du complexe phosphomolybdique bleu.

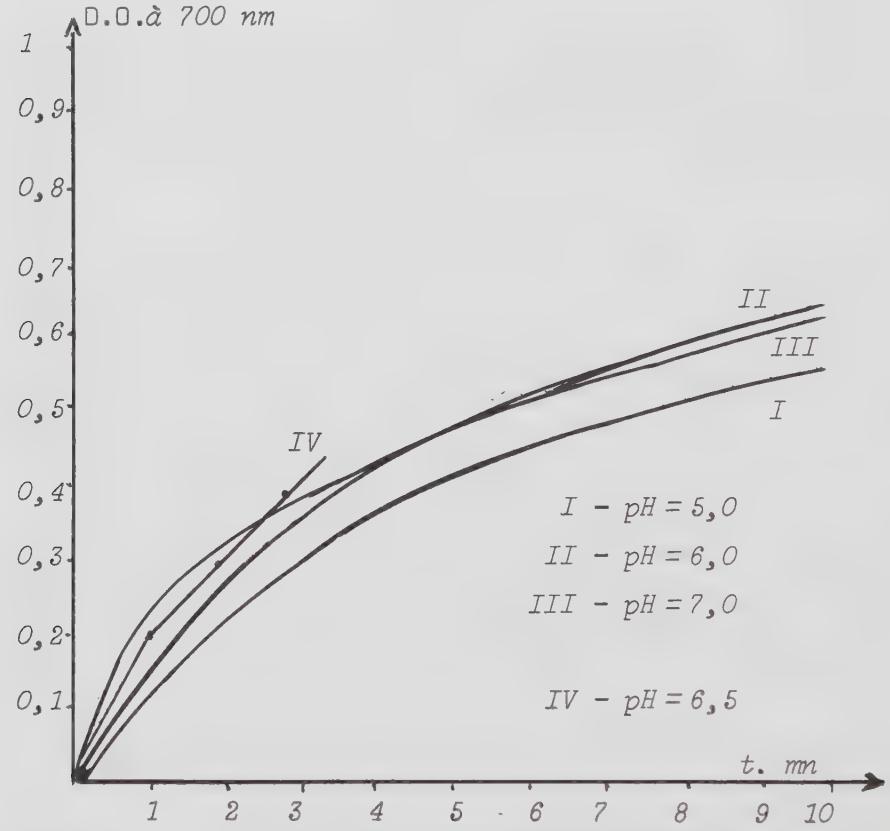
Le substrat préparé a été celui de DIFCO en tampon phosphates $\frac{M}{15}$ additionné de 1 p. 1000 de NaCl à la concentration de 66 mg de germes pour 10ml de tampon.

Une gamme a été préparée aux pH = 5, 0 - 5, 5 - 6, 0 - 6, 5 - 7, 0, partagée en deux séries d'essais à blanc et d'inconnus. Après thermostatisation à 37°C dans l'eau, une série reçoit pour 5 ml de substrat, 1 ml de solution de chlorhydrate de lysozyme à 1 mg/ml, l'autre série reçoit 1 ml d'eau.

Le tout est laissé 1, 5, 10 mn et au bout de chacun de ces temps, 2 ml du milieu en cours d'hydrolyse sont versés dans le mélange 1 ml de tungstate de Na à 10 p. 100, 1 ml de H_2SO_4 $\frac{2N}{3}$ pour inactiver l'enzyme.

Après centrifugation, 2 ml de surnageant sont additionnés à 2 ml de liqueur cuprotartro-alcaline. On porte 7 mn au BM 100°C, refroidit, puis ajoute 2 ml de réactif phosphotungsto-molybdique. Après agitation juste avant les lectures pour éliminer CO_2 , on détermine les D. O. à λ = 700 nm. Les chiffres lus sont

diminués de la D. O. des essais à blanc car le substrat s'hydrolyse légèrement à 37°C dans les conditions indiquées.



COURBES n° IX - DOSAGE DU LYSOZYME PAR REDUCTIMETRIE.

Dans les conditions de concentrations sus indiquées, c'est entre 6 et 6, 5 que l'optimum hydrolasique est atteint. Un autre essai a été réalisé à pH = 6, 5 pour atteindre les teneurs de substances réductrices libérées au bout de 1 mn.

La quantité de substrat a été doublée, soit 132 mg pour 10 ml de tampon ; les résultats ont été les suivants à pH = 6, 5 pour 1 mg/ml d'enzyme pour 5 ml de substrat.

D.O. lues à pH=6,5 après :	*1 mn*	*2 mn*	*3 mn*
	X_1 0,28	X_2 0,37	X_3 0,52
	B_1 0,08	B_2 0,07	B_3 0,12

Etalon de glucose à 30 µg/ml 0,14.

" " " à 60 µg/ml 0,28

En tenant compte des dilutions, c'est 250 µg d'enzyme par ml qui peuvent être ainsi dosés, au bout de la première minute, à pH = 6, 5, par réductimétrie.

Discussion :

Il n'est évidemment pas question de transposer les résultats réductimétriques en résultats turbidimétriques. Nous avons simplement montré ici qu' on pouvait atteindre la vitesse initiale hydrolasique au bout de 1 minute, même avec le substrat hydroinsoluble des germes.

Dans les mélanges complexes, il sera facile d'établir une courbe réductimétrique entre un étalon et des inconnus.

Cette méthode a l'avantage de la simplicité. Elle est réalisable dans des laboratoires non spécialisés, elle sera retenue dans l'analyse de mélanges complexes de médicaments contenant du lysozyme et des enzymes protéolytiques. - encore faudra-t-il qu'il n'y ait pas d'autres constituants susceptibles eux aussi de libérer des réducteurs.

Quant à l'interférence des protéases qui peuvent agir sur le lysozyme, il sera toujours prudent de préparer un essai à blanc contenant tous les autres constituants sauf le lysozyme à concentrations correspondantes à celles annoncées dans la préparation à analyser. Nous ne méconnaissons pas les critiques de cette méthode concernant la réoxydation de traces d'oxyde cuivreux, mais surtout, l'inconvénient est son absence complète de spécificité ; n'importe quelle enzyme hydrolasique

libèrera des substances réductrices du substrat de M. lysodeikticus. Le grief serait applicable à toutes les autres techniques réductimétriques. Elle permet des titrages jusqu'à 10 - 20 µg de glucose mais il faudra opérer avec des concentrations assez élevées en lysozyme, de l'ordre de 100 µg à 500 µg/ml.

Rappelons que c'est par réductimétrie au ferricyanure que COLOBERT et DIRHEIMER (25) ont dosé le lysozyme par son action hydrolasique en utilisant des concentrations d'enzyme de 30 à 100 µg/ml sur leur substrat hydrosoluble de M. lysodeikticus purifié par passage sur diéthylamino-éthyl-cellulose. Quel que soit le substrat retenu, l'activité hydrolasique ainsi mesurée est différente de l'action mucopolysaccharidasique. Malgré la sensibilité des réactifs de réductimétrie, cette méthode ne permet pas d'atteindre les faibles concentrations en enzyme dosées par turbidimétrie.

III - DOSAGE DU LYSOZYME PAR DIFFUSIMETRIE.

Qualitativement, l'utilisation de disques de papier imbibés de substance à tester déposés sur des boîtes de Petri garnies d'agar et ensemencées de M. lysodeikticus permet, après 18 heures de pousse, de dire s'il y a ou non activité lysozymasique.

Appliquée statistiquement au lysozyme comme le recommande le Codex 1965 pour les antibiotiques, cette technique – qui est celle de HEATLEY – permet des dosages comparatifs entre étalon et inconnus.

Elle a été utilisée pour les dosages de mélanges de lysozyme et d'antibiotiques comme celui de lysozyme et de bacitricine, dans une préparation contenant 5 mg de lysozyme base pour 200 unités de bacitracine.

Ce dosage n'est possible que s'il n'y a, aux concentrations indiquées dans la préparation, aucune interférence d'action des divers constituants sur chaque germe réputé spécifique. Dans l'exemple lysozyme bacitracine, on retiendra M. lysodeikticus pour le lysozyme,

et M. flavus n° 53. 160 de l'Institut Pasteur de Paris pour la bacitracine, rendu par culture uniquement bacitracino-sensible.

Cependant, si les souches microbiennes sont insuffisamment sélectionnées comme ce fut le cas pour certaines souches de M. flavus du LNSP, nous avons dû traiter au préalable le mélange par l'éthanol pour précipiter le lysozyme, la bacitracine restant soluble dans ce solvant.

Dans ces conditions, le dosage du lysozyme – et celui de la bacitracine – deviennent alors possibles mais avec une précision de dosage qui n'est guère supérieure à ± 15 p. 100.

Cas du mélange lysozyme - protéase - bacitracine.

Ce mélange est concrétisé par l'analyse de la préparation contenant lysozyme base, papaïne, bacitracine où, si l'on retient la méthode par diffusimétrie pour le dosage du lysozyme, il y a un risque d'interférence de la papaïne.

Aux concentrations indiquées (lysozyme 5 mg, papaïne 2 mg, bacitracine 200 UI), la croissance de M. lysodeikticus est limitée par le halo d'antibiose du lysozyme seul en gel d'agar.

Cependant, si le gel d'agar contient en outre un milieu nutritif azoté permettant les cultures microbiennes, ce qui est généralement le cas, il y a en outre une protéolyse produisant un éclaircissement du gel, mais cet effet est diffusé dans toute la masse du milieu de culture.

Cette protéolyse – qui est très classique et visible dans la gélatine – ne doit pas être confondue avec les halos d'antibiose dus au lysozyme seul dans les boîtes ensemencées avec M. lysodeikticus, ou dans celles ensemencées avec M. flavus n° 53. 160 pour la bacitracine.

Les halos restent SUPERFICIELS et se distinguent aisément de l'éclaircissement protéolytique . Ils se mesurent en plaçant les boîtes sur fond noir et en les éclairant latéralement.

IV - ESSAIS DE DETERMINATION D'ACTIVITE AMIDASIQUE PUIS MURAMIDASIQUE.

1°/ Essai de mise en évidence d'une action amidasique non spécifique.

Possédant les substrats synthétiques hydrosolubles conseillés par le Codex pour les dosages de la chymotrypsine et de la trypsine, nous avons essayé les substrats suivants :

- N- Benzoyl-arginine,
- N-alpha benzoyl-l-arginine éthyl-ester (B. A. E. E.)
- N-acétyl l-tyrosine éthyl-ester (T. A. E. E.),

provenant de l'Industrie Biologique Française de Gennevilliers.

Les concentrations retenues ont été voisines de celles conseillées par la Pharmacopée : 10 à 20 mg de chlorhydrate de lysozyme dans 100 ml de tampon phosphates0, 05 M, de pH : 7, 0.

On verse 1 ml de solution de chlorhydrate de lysozyme à 1 mg/ml dans 3 ml des substrats tamponnés à 25°C sous courant d'azote dans le potentiomètre METROHM-HERISAU.

Après 30 mn d'action du chlorhydrate de lysozyme sur les substrats, aucune activité amidasique n'a pu être mise en évidence.

On peut donc en déduire que le chlorhydrate de lysozyme ne possède ni activité amidasique pure (sur N-benzoyl-arginine) ni activité double estérasique et amidasique avec les deux autres substrats .

En reprenant le travail de RICK, cité par BERGMEYER (13), nous n'avons donc pu retrouver la règle de SCHWERT et EISENBERG (98), que nous nous proposions de vérifier par cette expérience, c'est-à-dire que l'action estérasique est plus intense que l'action amidasique.

Notre expérience négative élimine à première vue la présence d'enzymes protéolytiques ou d'un effet protéasique dans les chlorhydrates de lysozyme que nous avons testés.

2°/ Essai de mise en évidence d'une action muramidasique.

C'est avec l'espoir d'une mise en évidence et peut-être de réaliser un dosage spécifique muramidasique, que nous avons repris la réaction d'ELSON et MORGAN (32).

Celle-ci nous avait été précieuse pour doser la méthyl-2 glucosamine des antibiotiques streptomycine et dihydrostreptomycine.

Nous avons en effet présenté en 1970 (7) un travail sur ces médicaments. La streptomycine donne une réaction fortement positive alors que la dihydrostreptomycine n'en fournit pas ou une réaction très faible.

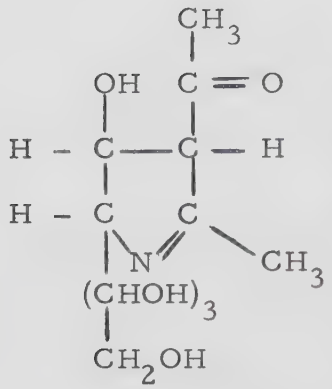
Après hydrolyse chlorhydrique, la dihydrostreptomycine donne à son tour une réaction de même intensité que la streptomycine.

Nous rappelant alors des essais en 1955 de REISSIG, STROMINGER et LELOIR (96) qui n'avaient pas porté sur le lysozyme, nous avons repris la réaction d'ELSON et MORGAN (32) modifiée par AMINOFF et coll. (5) et partiellement expliquée par PESEZ, POIRIER et BARTOS (93), comme indiqué ci-après.

Il n'est peut-être pas inutile de rappeler que les 2-méthylamino-oses tendent, en présence d'acétylacétone, à former un cycle pyrrolique qui pourra être condensé avec le réactif d'EHRLICH-KOVACS au para diméthylaminobenzaldéhyde pour fournir un chromogène rose-rouge.

Quand il s'agit d'acétylamino-sucres, l'addition d'acétylacétone est inutile.

Peut-être que le radical acétyle est transformé en acétylacétone par simple décarboxylation ; ce n'est qu'une hypothèse suggérée par le travail de



SOODAK (104) sur l'acétylation de la glucosamine par des extraits de foie de pigeon

$$CH_3CO + |H|-CH_2-CO + CH_3-COOH + \frac{1}{2}\,O_2 \rightarrow CH_3-CO-CH_2-CO-CH_3 + CO_2 + H_2O$$

Nous avons essayé des dosages avec et sans acétyl-acétone en reprenant les conditions opératoires que nous avions utilisées pour la streptomycine, inspirées du travail de BOAS (14) et des remarques de REISSIG (96).

Réactifs :

1°- Réactif d'EHRLICH :
- Paradiméthylaminobenzaldéhyde ..... 0, 4 g
- Alcool éthylique à 95° GL ..... 7, 5 ml
- HCl d^e = 1, 18 (10 M) ..... 7, 5 ml

2°- Réactif avec acétylacétone :
- Na_2CO_3 N ..... 24, 5 ml
- Acétylacétone, incolore de PE=138° ..... 0, 5 ml

3°- Tampon tétraborate de K $\frac{M}{15}$ ..... pH = 10

4°- Na_2CO_3

5°- Etalon fort de N-acétyl-D-glucosamine de KOCH-LIGHT ..... 1 mg/ml

6°- Etalon de chlorhydrate de lysozyme cristallisé ..... 100 µg/ml

7°- Substrat tamponné de DIFCO de pH = 7, 0
- tampon sec ..... 50 mg
- germes M. lysodeikticus ..... 10 mg
- eau distillée ..... 100 ml
- ajuster à pH = 7, 0 au potentiomètre.

Mode opératoire :

1er temps : hydrolyse muramidasique 1 heure à 60°C.
- 1 ml de solution d'enzyme
- 8 ml de substrat
- filtrer au bout de 1 heure.

2ème temps : dosage des amino-sucres.

- A 1 ml de filtrat, réajuster à pH 10 avec du tampon borate pH = 10.
- Porter 3 mn au B. M. 100° C. Froidir.
- Ajouter 6 ml d'acide acétique glacial.
- Ajouter 1 ml de réactif d'EHRLICH.
- Porter 20 mn à 37° C au thermostat à eau.
- Replacer à 20°C et lire après une heure à 550 nm.

La coloration est faible, et donne D. O. = 0, 2.

Devant ce résultat décevant, on a remplacé la poudre sèche de DIFCO par des germes vivants, en pleine croissance ; les chiffres ont été du même ordre.

Dans un autre essai, tenant compte des constatations de COLOBERT, sur l'hexosamine présente au lieu d'acétyl hexosamine, on ajoute le réactif avec acétylacétone.

Un troisième essai a consisté à laisser l'enzyme agir 24 heures au lieu de une. Les résultats ne furent pas meilleurs.

Enfin, des essais, de 10° en 10° entre 20° C et 70°C furent également réalisés, sans conclusion favorable.

Discussion :

Cet ensemble d'essais prouve que la lyse muramidasique est lente. Nous rejoignons les conclusions de WIJS et JOLLÈS (111). Alors que la turbidimétrie et la réductimétrie permettent des dosages dans les premières minutes, les auteurs cités utilisent 15 mg d'un substrat de Mycobacterium les plus sensibles, et une concentration en lysozyme considérable (600 µg/ml)pour obtenir un résultat chiffrable. Ils doivent d'ailleurs laisser l'hydrolyse muramidasique se prolonger 24 heures à 37°C et à pH = 5, 8 pour ne voir apparaître que quelques microgrammes de chlorhydrate de glucosamine.

Malgré les espoirs que nous avions fondés sur l'utilisation de la réaction d'ELSON et MORGAN, il faut reconnaître, comme JOLLÈS, qu'avec des substrats naturels, on ne peut prétendre qu'à des "données d'ordre qualitatif".

Il faut que la libération des amino-sucres soit suffisamment importante et rapide pour permettre les dosages en quelques minutes.

Ce sera la seule justification de la substitution de l'appellation MURAMIDASE à celle de LYSOZYME, et il faut espérer des progrès tendant à l'obtention de substrats muramidasiques hydrosolubles.

Nous retiendrons toutefois la réaction d'ELSON et MORGAN mais à titre de "caractère qualitatif".

V - EXEMPLE D'ANALYSE D'UN CHLORHYDRATE DE LYSOZYME INDUSTRIEL ET DU LYSOZYME BASE.

A/ CHLORHYDRATE DE LYSOZYME.

A titre d'exemple d'analyse d'un chlorhydrate de lysozyme destiné à l'usage thérapeutique, nous proposons l'ensemble des caractères ci-après.

1°/ Caractères qualitatifs.

- Le chlorhydrate de lysozyme du blanc d'œuf de poule est une poudre blanche d'aspect cristallin. En réalité l'examen microscopique montre des paillettes écaillées qui pourront prendre l'état cristallin après 2 ou 3 recristallisations de solutions aqueuses saturées portées plusieurs jours au réfrigérateur.

- Cette poudre présente une saveur d'abord douceâtre, puis devenant rapidement sucrée, sans qu'on puisse préciser s'il s'agit d'une action glucidolytique quelconque.

- Le chlorhydrate de lysozyme est très soluble dans l'eau froide, insoluble dans la plupart des solvants organiques, en particulier le méthanol, l'éthanol et les alcools de P. M. élevés, propriété permettant la séparation du lysozyme d'autres médicaments alcoolo solubles comme la bacitracine.

- L'examen électrophorétique en tampon de DURRUM au barbital-barbital sodique de pH = 8, 6 soit sur papier, sur phoroslide, sur bandes d'acétate de cellulose (Cellogel) ou de polyacétate de cellulose (Sepraphor) ne devra donner qu'un seul pic.

Toute impureté protéique dépassant 1 p. 100 fera proscrire le lot de lysozyme analysé pour la voie injectable.

- La solution aqueuse à 1 p. 1000 est réductrice en présence des réactifs oxydants ferricyanurés, cupro-tartro-alcalins.

Cette même solution possède les propriétés des protéines, réaction intense avec le réactif de GORNALL ; précipitation avec les sels des métaux lourds. Le réactif de TANRET précipitera à froid mais le précipité sera pratiquement soluble à chaud du fait de la nature polypeptidique de l'enzyme.

- Une solution aqueuse à 0, 5 p. 1000 de chlorhydrate de lysozyme présentera un minimum d'absorption à 251 nm, un maximum à 282 nm.

Mise en évidence d'une activité muramidasique.

L'activité muramidasique ne pouvant être pour le moment que qualitative faute d'un accord sur la fixation du choix d'un substrat spécifique, sera déterminée comme indiqué précédemment sur substrat sec de M. lysodeikticus et dans les mêmes conditions, par utilisation de la réaction d'ELSON et MORGAN.

2°/ Caractères quantitatifs.

a/ Dosage de l'eau.

Déterminée par la méthode de Karl FISCHER, la teneur en eau ne devra pas dépasser 1 p. 100, le titre de l'enzyme s'abaissant assez rapidement quand le taux d'humidité atteint 3 à 4 p. 100.

b/ Taux de cendres.

Le taux de cendres au moufle à début de rouge pour ne pas volatiliser les chlorures, devra être inférieur à 2 p. 100.

Au-delà, c'est que le chlorhydrate de lysozyme n'aura pas été suffisamment débarrassé de NaCl provenant de sa préparation, du fait d'une dialyse incomplète.

3°/ Dosage du chlore total.

Ce dosage sera pratiqué par la méthode de CHARPENTIER-VOLHARD après attaque nitropermanganique pour détruire la matière organique.

On trouve de 1, 5 à 2 p. 100 en NaCl dans les produits industriels.

Si on veut la teneur exacte, la bombe de PARR la donnera.

4°/ Dosage du sodium et du potassium.

Par photométrie de flamme, on trouve :
Na : 0, 7 à 1 p. 100,
K : 0, 2 à 0, 3 p. 100.

5°/ Dosage du soufre total.

La bombe de PARR donne de 1, 6 à 1, 8 p. 100 de soufre total corespondant au soufre cystéinique.

6°/ Azote aminé.

Par formol-titration selon SOERENSEN, l'azote aminé libre est inférieur à 0, 5 p. 100.

La recherche de l'ammoniac par la méthode à la cellule de CONWAY doit être négative.

7°/ Azote total par kjeldahlisation.

La minéralisation sulfurique en présence du catalyseur de GUILLAUMIN (mélange des sulfates cuivrique et potassique) donne au moins 16, 5 p. 100.

8°/ Activité mucopolysaccharidasique.

Pour le produit pur, matière première, nous retiendrons la méthode turbidimétrique avec les modalités que nous avons précisées : emploi de germes secs de DIFCO, tampon phosphates $\frac{M}{15}$ additionné de 1 p. 1000 de NaCl, pH = 7, 0, thermostat à 37°C. Les concentrations en enzyme seront de 5 à 25 µg/ml, les lectures seront faites à 450 nm, au bout de la 1ère mn. pour exprimer en "unités enzymatiques" comme le font les anglo-saxons; en 20 mn et à 540 nm, si on opère par comparaison avec un étalon de chlorhydrate de lysozyme 3 fois cristallisé. Nous avons utilisé les étalons :
de N. B. C. (Nutritional Biological Comp.),
de G. B. I. (General Biological Inc.),
de SCHUCHARDT.

En dosage de routine, ces étalons 3 fois cristallisés pourront être remplacés par une bonne préparation, comme le chlorhydrate de lysozyme de l'Industrie Biologique Française de Gennevilliers donnant chromatographiquement un seul pic.

B/ LYSOZYME BASE.

Destiné à l'usage oral uniquement, ce lysozyme, moins purifié que le chlorhydrate se différenciera du précédent par son hydroinsolubilité.

Les caractères qualitatifs seront sensiblement ceux du chlorhydrate et la principale différence portera sur l'activité mucopolysaccharidasique.

Celle-ci sera réalisée sur une prise de 100mg qu'on dissoudra dans 2 ml HCl 0, 1 N et complètera à 100 ml. A l'aide de cette solution à 1000 µg/ml, on pratiquera des dilutions à 5, 10, 15, 20, 25 µg/ml comme pour le chlorhydrate.

Les résultats seront exprimés en pourcentage de l'étalon de chlorhydrate cristallisé et seront presque toujours compris entre 90 et 100 p. 100 de cet étalon.

*

CONCLUSIONS DU CHAPITRE I

Nous apportons dans ce chapitre, de nouvelles précisions concernant le dosage du lysozyme tant comme matière première médicament que comme constituant d'associationsmédicamenteuses.

1°- Le dosage turbidimétrique sur germes de M. lysodeikticus reste le plus sensible, en opérant les lectures en tampon phosphates $\frac{M}{15}$ à pH = 7, 0 à 37°C et en exprimant les résultats :

soit à 450 nm en unités d'activité enzymatique dont nous proposons une définition standardisée,
soit à 540 nm en pourcentage par rapport à un étalon de chlorhydrate de lysozyme cristallisé.

En aucun cas, avec un substrat insoluble, il ne saurait être question d'unités internationales.

2°- Le dosage réductimétrique à l'aide du réactif de FOLIN et WU, de même que le dosage diffusimétrique dérivant de la technique de HEATLEY sont précieux pour les dosages du lysozyme dans les mélanges médicamenteux complexes.

3°- Un essai de mise en évidence d'une action amidasique du lysozyme sur B. A. E. E. a été entièrement négatif.

4°- Un essai de dosage des amino-sucres libérés par le lysozyme toujours sur le même substrat, a exigé une hydrolyse trop prolongée. Il ne peut s'agir que d'une détermination qualitative.

5°- Ce chapitre se termine par un exemple de dosage concernant les matières premières : le chlorhydrate de lysozyme industriel et le lysozyme base.

CHAPITRE II

SENSIBILITE DU LYSOZYME VIS - A - VIS DES AGENTS D'OXYDATION

*

Nous avons orienté nos travaux dans deux voies parallèles :

1- la photodestruction de solutions de lysozyme,
2- la préparation d'un lysozyme iodé.

1°/ Photoinactivation de solutions de lysozyme.

a/ En lumière naturelle.

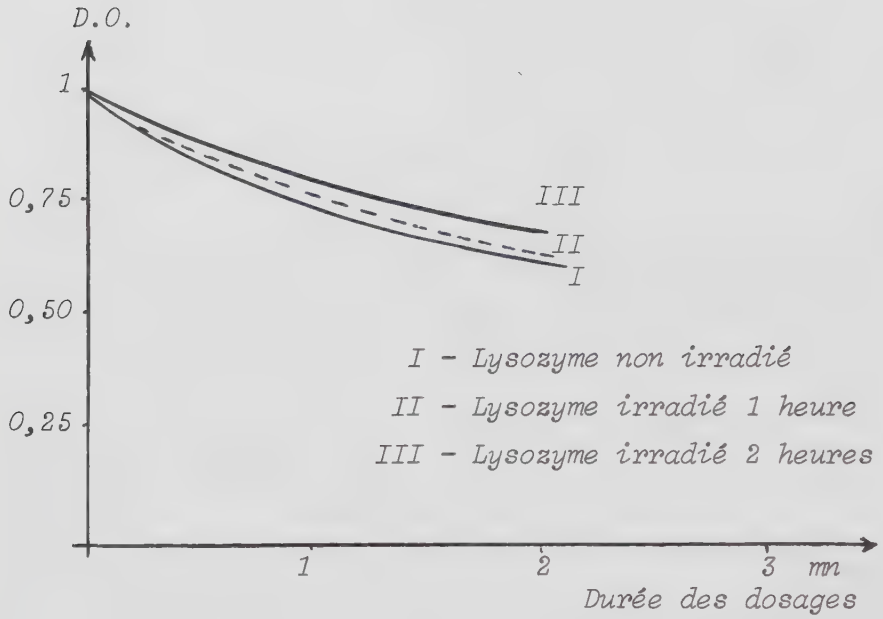
Une solution de chlorhydrate de lysozyme à 5 mg/ml dans l'eau distillée est laissée sur une table dans un laboratoire éclairé par une vive lumière solaire à la température de 20°C.

Le titre de la solution s'abaisse progressivement : 19 p. 100 de perte en 24 heures. Au bout de 5 jours, on ne retrouve pratiquement plus d'activité enzymatique.

b/ Sous une lampe à ultraviolet du fluoroscope.

Notre lampe présente les caractéristiques suivantes : fluoroscope électro-synthèse, avec lampe Sylvania Blacklite de 8 w.

La destruction, comme il fallait le prévoir, est plus rapide ainsi que le montrent les courbes ci-après :



COURBES n° X - DIMINUTION D'ACTIVITE DU LYSOZYME PAR IRRADIATION U.V.

Discussion :

Ces résultats sont en accord avec ceux de SHUGAR (100) de 1952 sur la photo-destruction ultra-violette du lysozyme. Ils s'expliquent probablement par la peroxydogénèse sous l'action des radiations étudiées en 1953 par PIFFAULT et coll. (94), au moyen de sources ultraviolettes, de rayons X et de rayons gamma.

Qu'il s'agisse de peroxydes ou de radicaux libres, le résultat final est la destruction de l'enzyme. La sensibilité particulière est sans doute due aux quatre ponts "disulfure" du lysozyme.

Il ne saurait être question ici de red-ox potentiel du lysozyme, puisqu'il n'y a pas de coenzyme dans l'édifice diastasique, alors qu'avec WURMSER (113) on peut faire jouer un rôle important à ce facteur.

Rappelons en effet que l'on connaît quelques red-ox potentiels de coenzymes :

- Catalase	+ 430 mV
- Polyphénoloxydase	+ 333 mV
- Ferment jaune	+ 60 mV
- Codehydrase I	- 290 mV
- NADH	- 320 mV.

Peut-être, sans parler de coenzyme, est-il logique de rappeler le système red-ox cystine $\rightleftharpoons$ cystéine qui doit être le plus sensible à l'oxydation.

La conséquence pratique sera l'obligation de conserver à l'abri de la lumière le lysozyme et ses solutions si on ne les utilise pas rapidement.

N. B. - Le red-ox potentiel n'est probablement pas le seul facteur. DENIS (28) a montré la baisse des titres des catalases utilisées en Pharmacie, malgré le red-ox élevé de son coenzyme (+ 430 mV).

2°/ Essai de préparation d'un lysozyme iodé.

Cette préparation a été envisagée afin de réaliser un collyre anti-inflammatoire et iodé. L'ophtalmologie utilise en effet des préparations à base d'iodures alcalins ou alcalino-terreux pour retarder l'opacification des milieux réfringents.

Le cristallin passe d'ailleurs pour contenir de l'enzyme comme la salive, le mucus nasal et les larmes. Il serait logique de savoir s'il n'y a pas parallélisme entre le taux de l'enzyme et les perturbations de la réfringence.

Nous avons donc essayé l'iodation du chlorhydrate de lysozyme dans les conditions suivantes :

Une solution aqueuse à 2 p. 100 de chlorhydrate de lysozyme est refroidie à 0°C. On ajoute goutte à goutte une solution décinormale d'iode préparée avec le minimum d'iodure de K, on cesse l'affusion dès que la teinte jaune persiste et on agite vivement.

Le lysozyme peut absorber 0, 25 p. 100 d'iode en 6 h.
0, 50 p. 100 d'iode en 12 h.
et on ne peut dépasser 0, 9 à 1 p. 100 en 24 h. sans inactiver l'enzyme.

Les liquides sont alors concentrés sous vide jusqu'à consistance épaisse.

On lave par trois fois avec quelques ml d'eau distillée pour éliminer l'iodure, puis on termine par une deshydratation complète sous vide avec P_2O_5.

Les dosages d'iode sont pratiqués après minéralisation à la bombe de PARR.

La préparation à 0, 25 p. 100 donne 0, 24 p. 100 d'halogène
à 0, 50 p. 100 donne 0, 48 p. 100 "
à 1 p. 100 donne 0, 95 p. 100 "

Ces résultats confirment que l'iode a été fixé à la protéine et pas seulement adsorbé.

L'essai lysozymasique a été pratiqué aussitôt sur germes secs de M. lysodeikticus.

L'activité enzymatique n'a pratiquement pas changé pour les préparations à 0, 25 et 0, 50 p. 100 d'iode.

Cependant, au bout de quelques mois, ces poudres, conservées à sec, ont montré une baisse de titre de 15 à 20 p. 100.

L'étude pharmacologique – d'ailleurs difficile sur l'œil d'animaux de laboratoire – n'a pas eu lieu.

Notre expérience d'halogènation, dans des conditions de concentration d'iode différentes de celles de HARTDEGEN et RUPLEY (47) prouve toutefois une certaine résistance du lysozyme quand on fixe l'halogène à de faibles concentrations et à 0°.

Les auteurs ci-dessus ont en effet inactivé le lysozyme par I_3^- 0, 5 M, soit à 12, 7 p. 100 d'halogène, alors que nous avons opéré avec au plus 1 p. 100.

*

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Les solutions aqueuses diluées de chlorhydrate de lysozyme résistent mal à la photodestruction en lumière visible, et en U. V.

L'iodation du lysozyme n'est possible que par fixation de faibles taux d'halogène. Au-dessus de 1 p. 100 il y a inactivation. Par ailleurs, la stabilité de l'iodolysozyme est insuffisante pour envisager une utilisation thérapeutique.

CHAPITRE III

LA THERMOSTABILITE DU LYSOZYME

*

A la suite de nos déterminations tendant à fixer à 37°C l'optimum de la mesure de l'activité lysozymasique par turbidimétrie, il nous paraît intéressant de rapporter également deux types d'expériences concernant l'influence du facteur température.

Elles concernent :

1°- La stabilité thermique du chlorhydrate de lysozyme en solution,
2°- Une mise en évidence d'une activité lysozymasique dans une poudre de blanc d'œuf.

I - THERMOSTABILITE DU CHLORHYDRATE DE LYSOZYME EN SOLUTION.

Une solution de chlorhydrate de lysozyme à 1 p. 100 à pH = 5 et à 100°C est stable pendant quelques minutes.

La baisse progressive du titre est encore inférieure à 10 p. 100 pendant les 5 premières minutes.

Au bout de 30 mn, l'activité lisozymasique mesurée par turbidimétrie a totalement disparu.

Discussion :

Nos résultats sont en accord avec ceux de JOLLÈS, LEDIEU et ZUILI (64) sur la thermorésistance des lysozymes de rates de lapin et de chien à pH = 4, 5 à 100° pendant 3 minutes, mais nous n'avons pu

confirmer les résultats exceptionnels de SMOLELIS et HARTSELL (103) n'observant que 10 p. 100 de perte environ à 121° C en 5 mn.

Si nous comparons nos résultats avec ceux d'autres travaux, nous pouvons en déduire des considérations très importantes.
SUMNER et SOMERS (107) en 1953 ont cru devoir préciser la nature "toute protéique" des enzymes et classer sommairement l'optimum thermique des enzymes animales entre 40° et 50°C, celui des enzymes végétales entre 50° et 60°C.

L'inactivation thermique serait pour eux la règle vers 60°C du moins pour les premières. La "décomplémentation" des sérums en serait une preuve.

Il est d'ailleurs instructif de rappeler selon NORTHROP, KUNITZ et HERRIOTT (87) qu'en 1928, WILLSTAETTER avait conclu – un peu hâtivement – que les enzymes n'étaient pas de nature protéique d'après l'accroissement de leur activité en fonction des dilutions. En effet, pour cet auteur, l'activité enzymatique persistait alors que les réactions classiques des protéines disparaissaient par suite de ces dilutions.

Malgré cette inexactitude, les dosages enzymatiques de WILLSTAETTER font encore autorité en Europe Centrale, et ses "unités" très largement employées.

Pour NORTHROP et coll. (87) en 1948, la thermostabilité des enzymes cristallisées est la suivante :

1°- La chymotrypsine en solution HCl 0, 0025 M est rapidement et complètement inactive à 100°C. Il y a formation d'une protéine dénaturée précipitable par NaCl 2 M.

Cependant, après chauffage, cette même solution refroidie à 20°C retrouve son activité et la protéine enzymatique redevient soluble dans NaCl M. Il y a eu inactivation reversible dans ces conditions.

2°- La trypsine est beaucoup plus thermosensible. Chauffée à 40°C, elle conserve son activité à 100 p. 100, mais n'en possède plus que 12 p. 100 à 50°C.

Il s'agit sans doute de la trypsine brute, complètement inactivée irréversiblement par chauffage à 70°C, puisque les mêmes auteurs précisent "que la trypsine peut être chauffée à l'ébullition sans perte d'activité"... ce qui est paradoxal.

3°- La ribonucléase cristallisée conserve son activité à 100°C à pH = 2, 0. A pH = 5 et aux pH alcalins, la dénaturation et l'inactivation apparaissent graduellement.

4°- L'hexokinase de la levure, active de 5° à 27°C, est rapidement inactivée au-dessus.

5°- L'inhibiteur du soja est thermostable reversiblement jusqu'à 70°C puis irréversiblement après une heure à 90°C.

BOULANGER, POLONOVSKI, TAYEAU et coll. (16) signalent aussi que la pepsine pure résiste à 100°C pendant un temps non précisé.

Plus près de nos résultats sur la thermostabilité du lysozyme sont les travaux de MOCHAYEDI (81) de 1962 à Bordeaux au Laboratoire de Matière Médicale du Professeur MASQUELIER.

Cet auteur a démontré que la glucosidase de Ruta graveolens était stable à sec à l'étuve électrique à 100°C. Il faut atteindre 150°C pendant 1 heure pour obtenir sa destruction .

Même constatation de ces auteurs avec la rhamnodiastase qui supporte elle aussi, à sec, 1 heure à 150°C.
C'est à notre connaissance la température de thermorésistance la plus élevée qui ait été citée.

Toutefois, à la chaleur humide du bain marie bouillant, pendant 1 heure, ou de l'autoclave à 120°C, la disparition de l'activité enzymatique devient totale.

La papaïne est aussi thermostable jusqu'à 80°C en chaleur humide.

Il n'est peut-être pas interdit de mettre en parallèle cette thermorésistance et la grandeur des masses moléculaires :

	P. M.	Thermostable jusqu'à
- Ribonucléase	12 700	100°C
- Lysozyme	14 400	100°C
- Chymotrypsine	23 000	100°C
- Papaïne	20 700	80°C
- Trypsine cristallisée	23 800	100°C

Il semble qu'il s'agisse d'une règle qui pourrait être énoncée : "Les enzymes dont les masses moléculaires sont les plus faibles sont les plus thermorésistantes".

Cette résistance peut être attribuée à la nature polypeptidique de ces enzymes.

Ainsi la catalase, protéine de PM = 225. 000 est détruite par chauffage quelques minutes à 50°C.

L'hexokinase, thermosensible, a un PM de 96. 000.

On peut aussi discuter de cette thermostabilité par une sensibilité thermique différente entre les enzymes et leurs inhibiteurs, quand il en existe.

L'inactivation de l'inhibiteur pourrait renforcer l'activité propre de l'enzyme, expliquant ainsi la thermorésistance de cette dernière.

Une conséquence pratique de cette thermorésistance est la possibilité de stériliser les solutions de cristal enzyme à des pH convenables.

Outre la filtration sur bougies pour permettre une stérilité suffisante, la tyndallisation et la flash pasteurisation des solutions de lysozyme sont possibles.

Ces opérations sont "thermiquement" réalisables sans perte d'activité. Elles pourront permettre la lyophilisation dans les flacons destinés à la voie injectable comme pour les pénicillines.

II - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE LYSOZYMASIQUE DANS UNE POUDRE DE BLANC D'ŒUF.

La poudre de blanc d'œuf de poule est préparée dans l'industrie par deshydratation sous vide et passage sur des cylindres chauffés.

Nous avons essayé la caractérisation du lyso - zyme par la technique turbidimétrique, mais sans résultat appréciable.

Il nous a semblé intéressant de reprendre au laboratoire la dessiccation des blancs d'œuf frais.

La deshydratation de blancs d'œuf frais privés de chalazions a été pratiquée aux températures suivantes : 50°C, 80°C, 100°C sous vide de 5 mm de mercure.

- La teneur en extrait sec est de 16 p. 100 - THOMAS (109) donne de 12 à 15 p. 100.
- La même expérience a été reprise après addition et avant la deshydratation de :
  1 p. 100 de glycine dans le blanc d'œuf frais, ou de
  1 p. 100 de chlorhydrate de cystéine dans le blanc d'œuf frais.

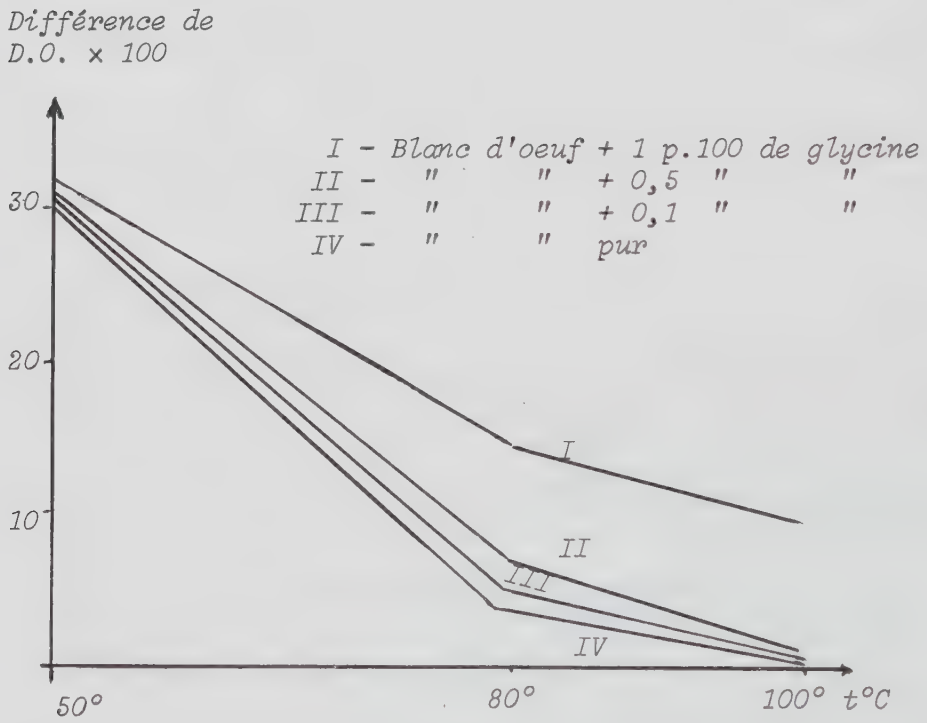
Si l'on tient compte d'une concentration de 1 g de lysozyme dans 1000 g de blanc d'œuf frais, et sachant que la deshydratation est de 84 p. 100, une quantité de 160 mg de poudre sèche correspondant à 1 g. de blanc d'œuf frais sera diluée au 1/40 ce qui donnera 25 µg de lysozyme dans 1 ml de blanc rehydraté.

1 g de blanc d'œuf frais dilué au 1/40 donne une diminution de D. O. de 0,35.

Les résultats sont les suivants :

Diminution des D.O. p. 100 en 1 mn à 450 nm		
Température	*Blanc d'oeuf rehydraté*	*Blanc d'oeuf rehydraté + 1 p. 100 glycine*
50° C	30 p. 100	32 p. 100
80° C	4 p. 100	16 p. 100
100° C	0 p. 100	11 p. 100

Ils sont schématisés par les courbes n° XI ci-après :



COURBES n° XI - *ACTIVITE COMPAREE DU BLANC D'OEUF DESHYDRATE AVEC ET SANS GLYCINE, EN FONCTION DE LA TEMPERATURE.*

D'autres expériences ont été reprises avec des concentrations plus faibles en glycine : 0, 5 p. 100 et 0, 1 p. 100 dans le blanc d'œuf frais.

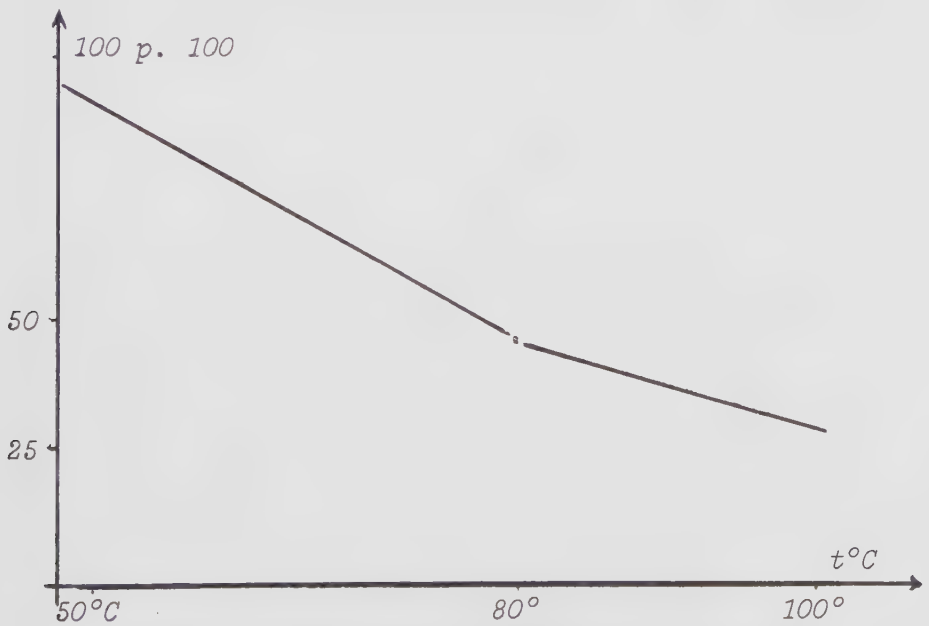
Mais si, à 50°C, l'activité lysozymasique est conservée, à 80°C et à 100°C nous observons une chute brutale de l'activité, si bien que les droites obtenues avec ces concentrations de 0, 5 et de 0, 1 p. 100 de glycine peuvent se superposer à la droite de l'activité du blanc d'œuf pur.

Seule, peut être intéressante l'activité conservée par l'addition de 1 p. 100 de glycine.

Si l'on rapporte à l'activité du blanc d'œuf chiffrée à 100 p. 100 avant la deshydratation, celle mesurée avec addition de 1 p. 100 de glycine puis deshydratée, on trouve :

à 50°C, une conservation de 91 p. 100 de l'activité,
à 80°C, une conservation de 45 p. 100 de l'activité,
à 100°C, une conservation de 31 p. 100 de l'activité,

résultats représentés par la Courbe n° XII ci-après :



COURBE n° XII - *POURCENTAGE D'ACTIVITE A 50°C, 80°C, 100°C, ENTRE LE BLANC D'OEUF ADDITIONNE DE 1 p.100 DE GLYCINE, PUIS DESHYDRATE, ET LE BLANC D'OEUF FRAIS PRIS = 100 p. 100 à 37°C.*

N. B. - L'addition de cystéine n'a pas donné la protection attendue.

N. B. - Le travail de HARTSELL (48) concerne la teneur en lysozyme de la poudre totale de l'œuf déshydraté.
Il étudie la conservation du lysozyme au cours du stockage, mais les conditions de la deshydratation n'y sont d'ailleurs pas précisées.

*

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

1°- Les solutions de chlorhydrate de lysozyme ne sont stables à 100°C que pendant les toutes premières minutes.

Cette thermorésistance est sans doute due au bas poids moléculaire du lysozyme. Elle permet la stérilisation des solutions.

2°- D'autre part, comme autre conséquence de la thermorésistance, la deshydratation des blancs d'œuf frais de poule peut se faire à 50°C avec une très faible perte de l'activité lysozymasique. A 80°C, la perte de l'activité est de l'ordre de 85 p. 100. Par contre, l'addition de 1 p. 100 de glycine préserve l'activité de 50 p. 100.

CHAPITRE IV

LE LYSOZYME DESTINE A LA VOIE ORALE
LA DIALYSE DU LYSOZYME

*

Nous n'étudierons dans ce chapitre que le comportement du chlorhydrate de lysozyme destiné à la voie orale, en comprimés ou en sachets, seul ou associé à d'autres médicaments.

Nous éliminerons donc les préparations du lysozyme visant à créer une asepsie bucco-pharyngée où son rôle antibiotique relève d'études de bactériologie .

Les préparations envisagées prétendent être douées de propriétés antalgiques et antivirales et on peut se demander ce que peut devenir le lysozyme dans le tube digestif.

Nous apportons une contribution expérimentale à ce problème, par quatre groupes d'expériences :

1°- Dialyse in vitro du lysozyme.

2°- Comportement du lysozyme in vitro vis-à-vis d'enzymes du tube digestif.
Etude d'un appareil de polydialyse.

3°- Comportement du lysozyme vis-à-vis de médicaments biologiques auxquels il peut être associé, et de quelques levures et champignons.

4°- Expérience in vivo tendant à démontrer le passage du lysozyme du tube digestif au sang.

I - DIALYSE IN VITRO DU LYSOZYME.

Les expériences suivantes ont été réalisées :

a) Dialyse en sac de cellophane,
b) Dialyse avec des membranes de cellulose,
c) Dialyse avec des membranes calibrées.

a/ Sac de cellophane.

Une solution de chlorhydrate de lysozyme à 5 mg/ml a été placée en sac de cellophance spéciale de L. K. B. 6390 - 1 et soumise à la dialyse contre de l'eau courante à l'obscurité.

Les baisses de titres de la solution de lysozyme ont été les suivantes :

1er jour 25 p. 100 environ,
2ème jour 34 p. 100 "
3ème jour 40 p. 100 "

b/ Membranes de cellulose SARTORIUS

Les membranes de nitrate de cellulose de 0, 05 µ SM 113-10
" de cellulose régénérée de 1 à 5 µ SM 115-39
" d'acétate de cellulose de 1 à 5 µ SM 117-39

ont été essayées en dialyseur de SARTORIUS pendant 12 heures à 20°C contre de l'eau distillée.

La dialyse a atteint 12 p. 100 en 2 heures, avec les membranes de 1 à 5µ.

c/ Dialyse sur membranes calibrées DIAFLO PM. 30.

Ces membranes sont non cellulosiques, constituées de polymères synthétiques non ioniques.

La membrane PM. 30 retient en principe 90 p. 100 des substances de PM > 35 000 permettant le passage de substances de PM inférieurs. Dans ces conditions, la dialyse de notre solution de chlorhydrate de lysozyme à 5 mg/ml a atteint 63 p. 100 en 12 heures à 20°C.

Discussion.

La dialyse du chlorhydrate de lysozyme est variable selon les membranes de cellulose ou de cellophane. Elle devient chiffrable avec les membranes calibrées, ce qui était prévisible.

Nous retrouvons ainsi les conclusions des premiers travaux de 1950 de FRAENKEL-CONRAT (36) et ceux de 1952 de SHUGAR (100). Cet auteur a démontré que les deux tiers d'une solution de chlorhydrate de lysozyme à 1, 2 mg/ml dialysaient en 3 jours à travers des membranes de cellophane.

La nature basique de l'enzyme jugée principal facteur de la dialyse par FRAENKEL-CONRAT, nous semble secondaire. C'est sa masse moléculaire qui est essentielle et la dimension des membranes utilisées pour la dialyse.

II - COMPORTEMENT DU LYSOZYME IN VITRO VIS-A-VIS D'ENZYMES DU TUBE DIGESTIF.

A/ Action de la PEPSINE seule.

Le suc gastrique humain contient environ 1 g de pepsine par litre, selon BOULANGER et coll. (16).

Nous avons mis en présence de suc gastrique artificiel du chlorhydrate de lysozyme à des concentrations correspondant sensiblement à son emploi en thérapeutique par voie orale.

Ce liquide gastrique artificiel est reconstitué avec HCl 0, 1 N additionné de 100 µg/ml de pepsine WORTHINGTON titrant 2 000 unités au mg, soit 10 fois moins que la concentration donnée par les auteurs ci-dessus; concentration choisie pour ne pas inactiver complètement le lysozyme.

a/ Lysozyme à faibles concentrations.

On pratique une série de dilutions contenant

1, 5, 20, 50, 100 mg de chlorhydrate de lysozyme dans 50 ml du liquide gastrique artificiel.

On porte ces dilutions à 37°C pendant 10 mn. Au bout de ce temps, on ramène les pH autour de 6, 5 à 7, 0, puis on réalise les dilutions afin de pratiquer le dosage turbidimétrique sur les germes de M. lysodeikticus dans les conditions que nous avons décrites.

Les dilutions sont ramenées comme d'habitude à 25 µg/ml.

Un essai à blanc avec la solution de pepsine diluée au 1/40 sur le substrat de M. lysodeikticus (5 ml de suspension en tampon phosphatespour 1 ml de dilution 1/40) ne donne aucune différence de D. O.

La pepsine seule n'a aucun effet sur le substrat.

Les dosages réalisés avec les 5 dilutions de lysozyme dans les 50 ml de liquide gastrique artificiel (soit 20 µg/ml, 100 µg/ml, 400 µg/ml, 1 000 µg/ml, 2 000 µg/ml) n'ont montré aucune diminution de D. O.

A ces concentrations, le lysozyme est complètement inactivé.

b/ Lysozyme à fortes concentrations.

Des concentrations 50 fois plus élevées dans le même liquide artificiel (soit 1 000 µg/ml, 5 mg/ml, 20 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml) ont été portées également à 37°C pendant 10 minutes.

Après dilutions convenables $\frac{1}{40}$, $\frac{1}{200}$, $\frac{1}{800}$, $\frac{1}{2000}$, $\frac{1}{4000}$ les D. O. sur le substrat ont donné les résultats suivants :

Concentration en lysozyme	*Diminution des D.O. p. 100*
1 mg/ml	0
5 "	0
20 "	12 p. 100 en 5 mn
50 "	40 p. 100 en 5 mn
100 "	9 p. 100 au bout d'une minute
	4 p. 100 la seconde minute

N. B. - Les essais sur 20 et 50 mg ont dû être lus en 5 mn, l'abaissement étant trop faible en 1 mn.

Le témoin de chlorhydrate de lysozyme à 25 µg/ml a donné une diminution de D. O. de 18 p. 100 au bout de la première minute.

B/ Action de la TRYPSINE seule.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec de la trypsine à un pH = 8, à des concentrations diluées de lysozyme, puis à des concentrations plus fortes. Nous opèrons avec une concentration en trypsine de 10 mg dans 100 ml avec une poudre titrant 200 unités de trypsine par mg (trypsine WORTHINGTON à 55, 6 p. 100 de protéines).

Les faibles concentrations en lysozyme (1, 5, 20, 50, 100 mg dans 50 ml) n'ont pas donné de diminution de D. O.

Pour les fortes concentrations, les résultats suivants ont été obtenus.

	Diminution des D.O. p. 100 à 450 nm
1 mg/ml (dilution 1/40)	10 p. 100
5 mg/ml (" 1/200)	12 "
20 mg/ml (" 1/800)	14 "
50 mg/ml (" 1/2000)	20 "
100 mg/ml (" 1/4000)	16 "

C/ Action de la PANCREATINE.

Ce sont toujours les fortes concentrations de chlorhydrate de lysozyme qui donnent un résultat positif avec diminution de D. O.

A partir de 5 mg par ml de chlorhydrate de lysozyme et jusqu'à 100 mg/ml les diminutions de D. O. sont identiques et égales à 20 p. 100.

N. B. - La différence entre le lysozyme donnant 18 p. 100 et celui que nous avons utilisé dans cette expé -

rience, 20 p. 100, provient de l'emploi d'un lysozyme fraîchement préparé dans le second cas.

Résultats.

1°- L'inactivation du lysozyme par la pepsine est complète pour les faibles concentrations de lysozyme que nous avons employées et dans nos conditions expérimentales.

Il faudra atteindre au moins 20 mg/ml dans un liquide gastrique artificiel pour qu'après passage à 37°C pendant 10 mn la destruction du lysozyme ne soit plus que de 89 p. 100.

Avec une concentration de 100 mg/ml, l'inactivation par la pepsine n'est plus que de 50 p. 100 environ.

Les préparations contenant du lysozyme et destinées à la voie orale devront contenir au moins 25 mg de chlorhydrate de lysozyme par prise pour échapper à la destruction par la pepsine.

Des doses de 100, 250, 500 mg seront nécessaires si l'on ne prend pas soin de procéder à une protection entérique.

Pour les faibles doses, la protection dite "entérique" s'impose.

2°- La trypsine et la pancréatine, sauf aux faibles concentrations indiquées n'inactivent pas le lysozyme.

Cette constatation rejoint les conclusions de GORINI, FELIX et FROMAGEOT (43).

De toute façon, l'enrobage de préparations ne se désintégrant que dans l'intestin, nous paraît indispensable.

D/ Comportement du lysozyme in vitro vis-à-vis d'enzymes du tube digestif en dialyse continue.

- Présentation d'un appareil d'étude par dialyse à différents pH en présence d'enzymes.

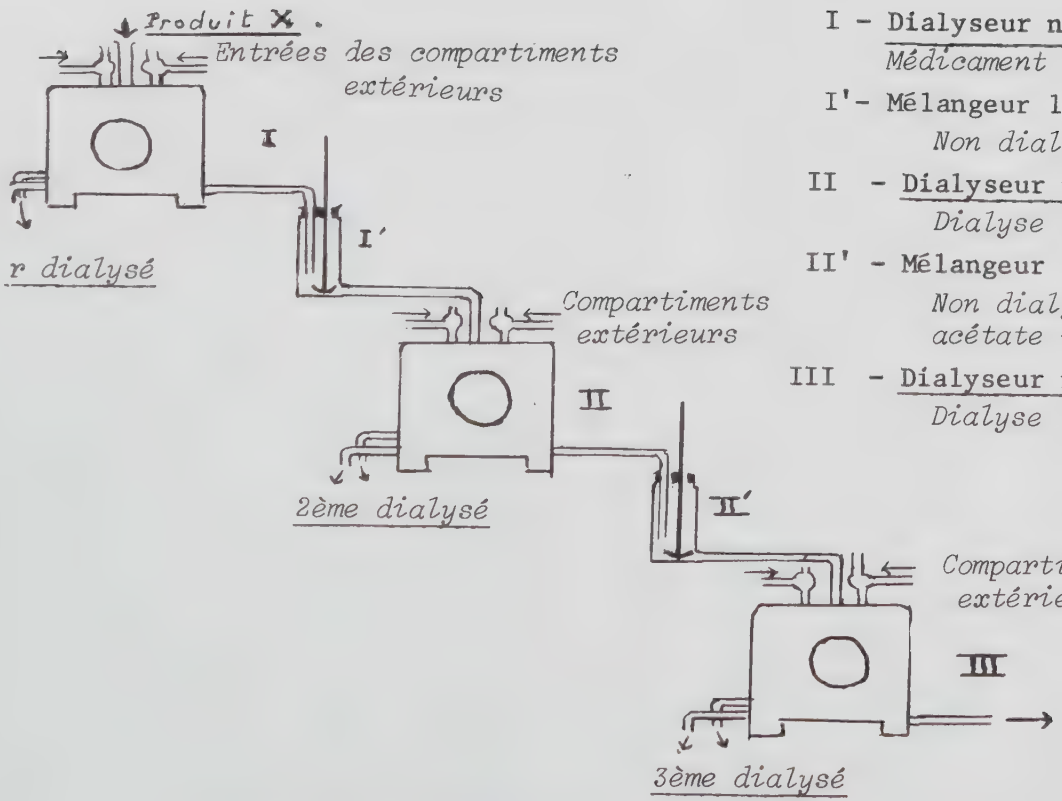
Nous présentons ci-après un appareil qui a été monté en vue de l'étude du métabolisme de divers médicaments et qui aurait pu servir en particulier à suivre le comportement du lysozyme à différents pH et en présence d'enzymes normaux du tube digestif humain, en dialyse continue.

Les trois dialyseurs, I, II, III sont ceux livrés par la firme SARTORIUS et correspondent à des diamètres de 50 mm pour la surface circulaire de dialyse. Ils peuvent fonctionner également en électrodialyse.

Entre chaque dialyseur, un petit récipient muni d'un agitateur permet de procéder à diverses modifications de pH de milieu réactionnel de telle sorte qu'on se rapproche à volonté des pH physiologiques des milieux de l'organisme humain.

Des additions d'enzyme sont prévues dans chaque récipient intermédiaire, le tout peut être thermostatisé par bain d'eau et soumis à un dispositif d'agitation.

L'analyse des produits ayant dialysé dans les compartiments extérieurs des dialyseurs n'a pas été entreprise. Il s'agirait alors d'une étude générale des métabolites du lysozyme, mais l'inactivation par la pepsine en réduit l'intérêt.



I - Dialyseur n° 1

Médicament X + amylase salivaire.

I'- Mélangeur 1'

Non dialysé de I + HCl 0,1 N + pepsine

II - Dialyseur n° 2

Dialyse "stomacale"

II' - Mélangeur 2'

Non dialysé de II + tampon $HNaCO_3$ + acétate + bile + pancréatine

III - Dialyseur n° 3

Dialyse "intestinale"

APPAREIL DE POLYDIALYSE POUR L'ETUDE DU METABOLISME DES MEDICAMENTS UTILISES PAR VOIE ORALE

III - COMPORTEMENT DU LYSOZYME visà-vis de quelques MEDICAMENTS BIOLOGIQUES, auxquels il peut être associé, et de quelques LEVURES et CHAMPIGNONS.

Ce paragraphe de notre Chapitre IV va être consacré :

3a) à l'action de quelques antibiotiques sur le lysozyme,
3b) à l'action du lysozyme sur les germes normaux de l'intestin, en particulier sur des "ferments" lactiques,
3c) à l'action du lysozyme sur quelques levures et champignons.

3a) Action de quelques antibiotiques sur le lysozyme.

En 1966, LESOBRE et AUBIN-HESSE (70) ont étudié une association polyantibiotique naphtacénique, macrolide et de lysozyme.

Il s'agit de chlorhydrate de tétracycline, d'érythromycine et de chlorhydrate de lysozyme.

Ultérieurement, pour la forme sachets destinée aux nourrissons et aux enfants, afin de diminuer l'amertume, le chlorhydrate a été remplacé par la base tétracycline.

Nous avons réalisé les déterminations sui - vantes :

- 50 mg de chlorhydrate de lysozyme sont préalablement dissous dans 50 ml HCl 0, 1 N.

- Dans une série de tubes on introduit 10 ml de cette solution. Dans deux tubes, on ajoute 200 mg d'érythromycine ; dans deux autres tubes, 250 mg de chlorhydrate de tétracycline.

- Un tube sur deux reçoit 10 mg de pepsine.

- Tous les tubes sont portés au bain-marie à 37°C pendant un quart d'heure.

Au bout de ce temps, l'activité lysozymasique est mesurée par turbidimétrie, en ayant soin de ramener le pH à 7, 0 et en diluant au 1/40 les solutions à doser pour obtenir 25 µg/ml de chlorhydrate de lysozyme.

Milieux essayés	Diminution des D. O. x 100
Témoin de lysozyme	20 p. 100
Erythromycine + pepsine + lysozyme	10 p. 100
Tétracycline + pepsine + lysozyme	8 p. 100
Erythromycine seule + lysozyme	12 p. 100
Chlorhydrate de tétracycline + lysozyme	10 p. 100

Résultats :

Dans nos conditions expérimentales, l'activité lysozymasique est perturbée par la présence des antibiotiques seuls et d'antibiotiques additionnés de pepsine.

Toutefois, alors qu'à de telles concentrations l'activité lysozymasique est détruite à 100 p. 100 par la pepsine seule, l'activité, en présence d'antibiotiques est préservée dans un ordre de grandeur de 50 p. 100.

La présence de fortes quantités d'antibiotiques perturbe l'activité lysozymasique, perturbation plus faible qu'en présence de pepsine.

Nous pouvons conclure que les antibiotiques tétracycline et érythromycine diminuent l'activité lysozymasique mais protègent le lysozyme de l'inactivation par la pepsine.

3b) Action du lysozyme sur des germes normaux de l'intestin, en particulier sur Lactobacillus acidophilus.

Après avoir étudié l'action de quelques enzymes digestives sur le lysozyme, nous allons envisager l'action de quelques germes hôtes normaux de l'intestin. Nous avons choisi les germes de Lactobacillus acidophilus.

Expérience :

5 tubes : A, B, C, D, E reçoivent :

Tube A : 500 millions de germes vivants de L. acidophilus,
10 ml de tampon phosphates $\frac{M}{15}$ pH = 7, 0
10 mg de chlorhydrate de lysozyme.

Tube B : un lyophilisat de 10 milliards de germes vivants de L. acidophilus
5 ml de tampon phosphates $\frac{M}{15}$ pH = 7, 0.
5 ml de milieu de culture pour ce Lactobacillus,
10 mg de chlorhydrate de lysozyme.

Tube C : identique au tube A, sans lysozyme.

Tube D : identique au tube B, sans lysozyme.

Tube E : étalon sans germes, de chlorhydrate de lysozyme 1 mg/ml en tampon phosphates.

Les 5 tubes sont portés à 37° pendant 2 heures. Au bout de ce temps, les dilutions au 1/40 sont réalisées pour obtenir la concentration optimum de 25 µg/ml.

Pour 1 ml de milieu réactionnel, on ajoute 5 ml de substrat de M. lysodeikticus. A 450 nm et après une minute, on observe les diminutions de D. O. x 100 :

Tube A	Tube B	Tube C	Tube D	Tube E
18 p. 100	18 p. 100	0 p. 100	0 p. 100	19 p. 100

Conclusion :

Les germes Lactobacillus acidophilus n'ont pas d'activité lysozymasique propre.

D'autre part, l'activité du lysozyme n'est pas perturbée par la présence de ces germes, hôtes normaux de l'intestin de l'Homme.

La médication au lysozyme peut être prescrite en même temps que celle des "ferments" lactiques.

3c) Activité fungistique du lysozyme.

Il est bien connu que certains complexes enzymatiques d'origine animale ou végétale présentent une activité lytique sur la paroi des spores des champignons filamenteux ou levuriformes : c'est en particulier le cas de la Cellulase ou de la Chitinase.

Nous avons voulu vérifier si une telle activité était obtenue avec le lysozyme.

Nous avons utilisé, pour ce faire :

- des souches de levures du genre Candida, appartenant à diverses espèces : C. albicans, C. tropicalis, C. krusei, C. quillermondi.
- des souches de champignons filamenteux à croissance rapide : Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, 2 souches de Penicillium Sp.

Le protocole adopté fut le suivant :

- Le lysozyme est mis en solution au 1/10 à partir d'une poudre lyophilisée, de chlorhydrate de lysozyme.
- La dilution est amenée à pH = 6, 6 à l'aide d'une solution tampon phosphates $\frac{M}{15}$.
- Elle est ensuite distribuée dans des tubes à hémolyse à raison de 1 ml par tube.
- Dans chacun des tubes, on ajoute une anse d'une culture de Candida ou d'Aspergillus ou de Penicillium prélevée sur milieu classique de Sabouraud.
- Les levures ou les spores sont laisséesen contact avec la solution de lysozyme pendant 48 h.
- Puis, ce temps écoulé, des subcultures sur milieu de Sabouraud sont réalisées à partir des levures ou spores traitées.
- Pour chaque espèce testée, une culture témoin est effectuée après un passage de 48 h des levures ou des spores en eau physiologique.
- Tous les tubes de culture sont incubés à 37°.

Résultats :

1°- Candida :

Après 24 heures :- Tous les tubes témoins présentent des colonies isolées.
- Pas de pousse sur les tubes traités au lysozyme.

Après 48 heures :- Cultures en nappe sur les tubes témoins par coalescence des colonies.
- Pas de pousse sur les tubes traités.

Après 4 jours :- Apparition de rares et petites colonies sur tous les tubes traités.

Après 5 jours :- Colonies isolées en assez grand nombre sur tous les tubes traités.

Après 8 jours :- Même aspect. Jamais d'aspect cultural en nappe.

On relève une action nettement fungistatique du lysozyme en solution au 1/10, mais aucune action fungicide.

2°- Aspergillus, Penicillium:

Après 48 heures :- Début de croissance du mycélium dans les tubes témoins.

Après 4 jours :- Mycélium abondant dans tous les tubes témoins.
- Pas de croissance dans les tubes traités.

Après 5 jours :- Début de croissance dans les tubes traités.

Après 8 jours - Aspect cultural à peu près identique dans tous les tubes (témoins et traités) où la densité mycélienne est la même.

Conclusion :

- Le lysozyme possède, aux concentrations utilisées, une action fungistique nette mais peu durable.

- Il est en définitive, après cet unique train expérimental, possible d'affirmer que le lysozyme en solution au 1/10, amené à pH proche de la neutralité, exerce vis-à-vis de champignons levuriformes du genre Candida, et de champignons filamenteux du genre Aspergillus et Penicillium, une action fungistique indéniable.

IV - ESSAI DE DEMONSTRATION DE DIALYSE IN VIVO.

Le passage du lysozyme du tube digestif dans le sérum sanguin.

Cette expérience a été réalisée sur un chien de 20 kg environ auquel on a administré 5 g de chlorhydrate de lysozyme par voie buccale.

Un prélèvement de sang a été effectué juste avant cette administration ; un nouveau prélèvement a été effectué 6 heures après.

Afin d'éliminer autant que possible les risques de l'interférence de la quantité de protéines sériques les mesures ont été effectuées sur 0,2 , 0,5 , 1 ml de sérum du chien.

En même temps, a été réalisé un étalonnage de la suspension de M. lysodeikticus à l'aide d'une solution de chlorhydrate de lysozyme à 10 mg/litre donnant pour 1 ml (10 µg), une D. O. de 1, 30 et 20 mn après, de 0, 25, à 540 nm.

Voici les résultats des lysozymémies obtenues in vivo.

Volume sérique	*D.O. x 100 avant traitement*	*D.O. x 100 6 heures après traitement*	*Différence et moyenne m.*
0,2 ml	82 80 81	55 56 56	27 24 m = 25 25
0,5 ml	70 71	38 46	32 25 m = 28
1 ml	62 61	28 28	34 34 m = 34

Les différences de dosages sur 0,2 , 0,5 , 1 ml montrent que la détermination de la lysozymémie doit être réalisée toujours dans les mêmes conditions pour obtenir des résultats superposables et que l'on ne peut exprimer ceux-ci, dans ces expériences, en µg/ml de lysozyme sérique.

Toutefois dans tous les cas, il y a, après l'ingestion, augmentation de la lyse de M. lysodeikticus, preuve d'une probable augmentation de la lysozymémie, celle-ci pouvant être chiffrée aux alentours de + 25 à + 30 p. 100.

Discussion :

L'expérience in vivo de passage du lysozyme du tube digestif dans le sang du chien mérite quelques remarques.

a) La dose de chlorhydrate de lysozyme administrée a été massive : 5 g par voie buccale, cette quantité n'a jamais été utilisée à notre connaissance chez l'Homme. Remarquons aussi qu'elle a été très bien tolérée, preuve de l'absence de toxicité apparente de l'enzyme employée par voie orale.

b) Le temps de 6 heures séparant l'administration orale du moment du prélèvement sanguin est

empirique. Il correspond probablement à un séjour prolongé dans l'intestin, ce qui est important pour justifier une action mucopolysaccharidasique possible dans le tube digestif pouvant accroître ainsi le passage d'autres médicaments associés (antibiotiques notamment).

c) Le dosage du lysozyme sanguin reste difficile et les résultats, nous le verrons plus loin, controversés.

d) Il n'en demeure pas moins que les dosages réalisés avec 0, 2 , 0, 5 , 1 ml de sérum ont montré un accroissement de la lysozymémie expérimentale après administration d'une seule dose massive de lysozyme.

Nous conclurons très prudemment en indiquant qu'il y a "présomption" d'accroissement de la lysozymémie du chien dans cette expérience in vivo.

*

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

1°- La dialyse in vitro du lysozyme est facile à mettre en évidence. Elle est fonction de la porosité des membranes.

2°- L'action des enzymes pepsine, trypsine, pancréatine en présence du lysozyme a été étudiée.

La pepsine stomacale inactive le lysozyme et il faut une concentration d'au moins 20 mg de lysozyme pour qu'il en subsiste dans l'intestin; la trypsine et la pancréatine n'altèrent pas le lysozyme aux concentrations physiologiques.

3°- Vis-à-vis de certains médicaments auxquels il peut être associé, l'activité lysozymasique est perturbée en présence d'antibiotiques du groupe naphtacène ou de macrolide. Cependant l'inactivation par la pepsine est atténuée par ces antibiotiques probablement par suite de leur effet tampon. L'activité du lysozyme est maintenue en présence des germes vivants lyophilisés de Lactobacillus acidophilus.

Toujours in vitro, une activité fungistatique, notamment vis-à-vis de Candida a été démontrée.

4°- Un passage in vivo du lysozyme dans le sang a pu être mis en évidence chez un chien après administration d'une très forte dose par voie orale et en une seule fois de 5 g de chlorhydrate de lysozyme.

L'accroissement relevé de 25 à 30 p. 100 de la lysozymémie doit être interprétée très prudemment.

CHAPITRE V

LE LYSOZYME DESTINE A LA VOIE INJECTABLE
L'ANTIGENICITE DU LYSOZYME

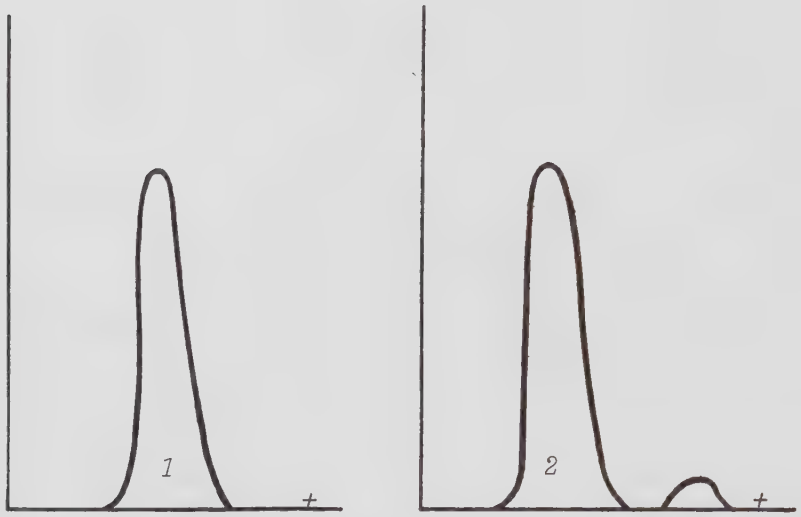
*

Le lysozyme, protéine de masse moléculaire relativement faible, est-il utilisable sans aucun risque par la voie injectable ?

Nous allons décrire des expériences in vivo démontrant la possibilité de reproduire chez l'animal de laboratoire des phénomènes d'antigénicité.

Nous sommes partis d'un chlorhydrate de lysozyme ne donnant qu'un seul pic par électrophorèse aussi bien en migration sur phoroslide que sur cellogel.

Voici 2 clichés d'électrophorèse en phoroslide et passés au phoroscope MILLIPORE, concernant 2 chlorhydrates de lysozyme, l'un de préparation récente, l'autre d'un produit 3 fois cristallisé provenant d'une firme spécialisée mais ayant séjourné près d'un an au réfrigérateur.



XIII - ELECTROPHORESES en "phoroslides" de LYSOZYMES

1°- Chlorhydrate de lysozyme frais

2°- Chlorhydrate de lysozyme 3 x cristallisé ancien

Expérience de sensibilisation de cobayes par le lysozyme

Protocole expérimental :

A/ Action du lysozyme à fortes doses :

— Un premier lot de 6 cobayes mâles adultes, souche Evic-ceba, pesant en moyenne 380 g, sont soumis à des doses fortes de sensibilisation 100 mg/kg de chlorhydrate de lysozyme d'œuf de poule.

Deux injections intrapéritonéales sont réalisées à un jour d'intervalle. Une injection déclenchante à 30 mg/kg de chlorhydrate de lysozyme est réalisée 15 jours après en I. V.

Voici les résultats :

La mort des animaux survient comme suit, indiquée par une croix.

n° cobaye	1ère injection	2ème injection	3ème injec. (déclenchante)
1	"	+	-
2	"		+ 5 mn après "
3	"		+ à l'injection "
4	"		+ à l'injection "
5	"		+ 3 mn après "
6	"		vivant "

B/ Action du lysozyme à doses faibles :

— Un deuxième lot de 6 cobayes de la même souche, pesant 400 g, est soumis à des doses plus faibles de sensibilisation de 10 mg/kg de chlorhydrate de lysozyme d'œuf, 3 injections à 3 jours d'intervalle. Une injection déclenchante de 3 mg/kg par voie I. V. est réalisée 15 jours après.

Tableau des résultats :

La mort des animaux survient :

n° cobaye	1er jour	6ème jour	9ème jour	Injection déclenchante
1	"	"	"	+ 5 mn après
2	"	"	"	+ 1 heure après
3	"	"	"	+ 5 jours après
4	"	"	"	vivant
5	"	"	"	+ 5 mn après
6	"	"	"	+ 5 mn après

Dans ces deux expériences, l'injection déclenchante du lysozyme a entraîné la mort des animaux, 4 sur 6 dans le premier lot (doses fortes), 5 sur 6 (dont 1 mort après 5 jours il est vrai) dans le deuxième lot.

Ces résultats sont significatifs d'une réaction de type anaphylactique.

Essais de confirmation in vitro de l'antigénicité.

Nous avons prélevé le sang des cobayes morts à la suite des injections déclenchantes, et celui des survivants.

Après centrifugation, les sérums ont été examinés en plaques d'OUCHTERLONY, puis colorés à l'amidoschwartz. L'examen de l'ensemble a été négatif.

Tous ces sérums ont été soumis à une immuno-électrophorèse, l'antigène étant constitué par une solution de chlorhydrate de lysozyme à 5 p. 100. Il n'a pas été possible d'affirmer la formation d'arcs de précipitation.

Discussion :

L'apparition des arcs de précipitation est fonction de la concentration des anticorps dans les sérums et il ne nous a pas été possible en raison des faibles quantités de sérums recueillies, de les concentrer en vue de réaliser une meilleure précipitation. Il est possible également que la réaction aurait eu plus de chances d'être positive si le prélèvement sanguin avait été effectué juste avant l'injection déclenchante.

Lorsqu'on s'assure au départ d'une pureté électrophorétique convenable du chlorhydrate de lysozyme injecté, la formation des arcs de précipitation avec les sérums de nos cobayes n'apparaît pas.

Toutefois, les cobayes sont morts par suite de bronchospasme histaminique, cette libération d'histamine étant vraisemblablement le résultat de la réaction antigène-anticorps.

Des déductions, encore hypothétiques, sont envisageables :

1°- Peut-on transposer à l'Homme les résultats obtenus avec le cobaye, animal de laboratoire, l'un des plus histamino-sensibles ?

Il y a quelques cas d'allergie au lysozyme relevés dans la littérature. SOLENTE (105) en 1961, a signalé

qu'un malade ayant reçu une injection I. M. de lysozyme -la première- présenta 30 mn après un œdème pharyngé avec chute tensionnelle ayant nécessité l'administration d'un antihistaminique pour éviter l'étouffement, et de diéthylamide nicotinique pour relever la tension.

LUVONI (73), en 1963, a signalé également deux cas mortels après une première injection I. M. de lysozyme.

Est-ce pour prévenir de tels chocs que GIRARD (39) en 1963 a étudié l'addition d'un dérivé du thioxanthène au lysozyme ?

Il semblerait même, avec JOLLÈS et JOLLÈS (63) que certains lots de lysozyme contiendraient un facteur antihistaminique qu'ils ont isolé et caractérisé.

Rien d'étonnant alors avec ces lysozymes contenant trop de facteurs antihistaminiques, que PARROT et coll. (91) aient au contraire inhibé le bronchospasme histaminique.

2°- Ces risques sont-ils dus au lysozyme lui-même ou à une "traînée" d'ovalbumine résiduelle ?

HANNOUZ (45) a démontré, par des chromatographies sur papier en solvant décanol, pyridine, acide acétique, eau (60 : 40 : 12 : 48) que les lysozymes commerciaux contenaient presque toujours des traces d'ovalbumine résiduelle.

GONÇALVES et coll. (42) en 1956 ont démontré par voie immuno-chimique, et par chromatographie, que des lysozymes cristallisés pouvaient contenir 2 à 3 p. 100 d'impuretés. Cette remarque a été relevée même pour de nombreuses enzymes cristallisées par NORTHROP (86) et DIXON et WEBB (30) signalent le "piège" possible de cette présence, souvent de l'ordre de 1 p. 100, et due peut-être à une syncristallisation.

Le travail de NICHOL, OGSTON et WINZOR (83) de 1967, recommandé par Pharmacia, prouve que la séparation de l'ovalbumine et du lysozyme par les SEPHADEX n'est pas chose aisée.

Ceci démontre combien il faut être très prudent dans les conclusions :

La précipitation d'arcs par immuno-électrophorèse peut être positive sans qu'on puisse affirmer s'il s'agit du lysozyme seul ou de l'impureté d'ovalbumine susceptible de l'accompagner.

Quelle que soit la protéine responsable de la réaction antigène-anticorps, le pourcentage de mort de cobayes démontre la réalité du risque.

C'est d'ailleurs l'écueil majeur de toute l'enzymothérapie malgré les espoirs qu'elle fait naître. Rappelons ici l'opinion récente de OHNUMA, HOLLAND, FREEMAN et SINKS (88) de 1970 concernant l'emploi de l'asparaginase en thérapeutique humaine :

"Il faut être circonspect à défaut d'observations cliniques exactes et serrées sur la sensibilisation des malades et la rapidité d'une réponse immunologique vis-à-vis de la protéine enzymatique".

*

CONCLUSIONS DU CHAPITRE V

L'antigénicité du lysozyme est démontrable in vivo chez le cobaye. Avec des doses d'injections sensibilisantes de 100 mg/kg ou de 10 mg/kg de chlorhydrate de lysozyme, on obtient par une seule injection déclenchante de 30 mg/kg dans le premier cas et 3 mg/kg dans le second, la mort de 5 animaux sur 6.

L'immuno-diffusion et l'immuno-électrophorèse réalisées avec le sérum des cobayes morts ont été toutefois négatives.

Il est difficile d'affirmer que les réactions observées sont dues à la protéine enzymatique du lysozyme seule ou à un reste d'ovalbumine.

CHAPITRE VI

RECHERCHES DE LYSOZYMES AUTRES QUE CEUX PROVENANT DU BLANC D'ŒUF DE POULE

*

Nous avons vu, dans la Première Partie, la liste des sources de lysozyme actuellement connues.

En raison des possibilités d'extraction de lysozymes de ces matières premières, nous avons été conduit à extraire le lysozyme des globules blancs humains d'une part et de quelques végétaux d'autre part, avec des possibilités d'applications thérapeutiques.

Le lysozyme de globules blancs humains normaux pouvait en effet être étudié pour réaliser le rejet de greffes expérimentales puisque c'est précisément pour éviter le rejet de greffons d'organes qu'on utilise du sang dépourvu de ses globules blancs.

N. B. - Le lysozyme sanguin fera l'objet de ce présent chapitre, les lysozymes végétaux celui du Chapitre VII.

*

LE LYSOZYME SANGUIN HUMAIN

Nous distinguerons l'étude du lysozyme sérique de celle du lysozyme des globules.

I - LE LYSOZYME SERIQUE HUMAIN.

Le lysozyme sérique a fait l'objet d'assez nombreuses études, et s'est soldé par un ensemble de résultats particulièrement disparates.

Ainsi, en 1967, BABIN Ph. (8) a-t-il relevé, à l'AFAS, des chiffres recueillis dans la littérature :

MASAZZA , POLVANI	31	µg/ml
CRIFO, STELLO	12, 9	"
FLORIO	9, 5	"
VOGLIAZO	6, 6	"
MASCHERPA	0, 2	"

Lui-même, en 1962, a trouvé "statistiquement" le chiffre de 4, 8 µg/ml, très voisin du résultat de 1966 par GLYNN (41) "environ 5 µg".

CHARLEMAGNE et JOLLÈS (21) en 1966 également ont trouvé 13, 5 µg/ml ± 3, 1 pour la normale, ce qui leur fait dire que le chiffre de 4 µg est "fortement abaissé" alors qu'il serait considéré comme tout à fait normal par Ph. BABIN et par GLYNN.

Moins absolus sont les résultats de ZUCKER et coll. (116) de 1970 annonçant 7 à 15 µg/ml, avec chiffres plus élevés chez l'Homme que chez la Femme.

L'explication est peut-être trouvée par deux voies différentes :

a) La dialyse facile du lysozyme qui fait que si on ne centrifuge pas le sang sitôt le prélèvement, il peut y avoir passage du lysozyme des polynucléaires dans le sérum, à une vitesse fonction peut-être de l'activité des "perméases".

b) La nature même du réactif anticoagulant employé. Si on retient la remarque de KRAVCHENKO (68) sur l'inactivation de la muramidase par les ions Ca^{++} et Mg^{++}, les discordances peuvent s'expliquer . De toutes façons, les teneurs en lysozymes sérique humain sont très faibles. Il n'est pas logique d'en prévoir l'extraction.

II - LE LYSOZYME DES GLOBULES BLANCS HUMAIN.

La communication de CHARLEMAGNE et JOLLES (21) de 1966 donne des chiffres plus détaillés concernant les teneurs en lysozyme des globules blancs.

Pour ces auteurs, les plaquettes sanguines ne contiennent pas de lysozymes ; les globules blancs normaux en contiennent 11, 5 mg $\pm$ 40 p. 100, par gramme de poids sec.

Le dosage du lysozyme des globules blancs de leucémiques a donné les résultats suivants :

- globules blancs de malades atteints de leucémie myéloïde chronique : ..... 16 mg
- globules blancs de malades atteints de leucémie lymphocytaire chronique : 0, 5mg
- globules blancs de malades atteints de leucémie aiguë monoblastique : ..... fortement augmenté
- polynucléaires isolés : .....43 mg

Nous avons pensé utiliser des globules blancs humains normaux comme source de lysozyme susceptible peut-être d'applications médicamenteuses.

Nous avons donc extrait du lysozyme de globules blancs humains en vue :

— de vérifier si ce lysozyme présentait les mêmes propriétés antigéniques que celui extrait du blanc d'œuf de poule.

— de rechercher s'il pouvait présenter quelqu'effet vis-à-vis de la tumeur expérimentale de GUERIN.

1°- Extraction de lysozyme des globules blancs humains selon BABIN, DELMON, BABIN (9).

Mode opératoire.

- Les globules blancs humains proviennent de leur récupération sur filtres de cellulose spéciale de EUROPARENTERAL S.A. FENWALL Division. Ces filtres permettent une séparation convenable des leucocytes. Ils sont débarrassés des quelques globules rouges toujours retenus par 4 à 5 lavages au sérum NaCl à 9 p. 1000 jusqu'à ce que les eaux des filtres ne soient plus teintées de rose.

- Les gaines de matière plastique sont sectionnées de bas en haut, et les filtres de cellulose extraits. Le disque de globules blancs puis l'ensemble de chaque filtre sont traités 5 fois de suite par 20 ml environ d'eau distillée, portée à 40°C avec 5 expressions à la presse pour obtenir l'éclatement des globules. On termine par un broyage au TURMIX jusqu'à obtention d'un liquide visqueux à fort effet TYNDALL.

Le liquide est ajusté à pH = 4, 5 par CH_3COOH N. On immerge 30 sec. à 100°C, puis centrifuge le tout pour éliminer le précipité de protéines étrangères.

- La suite de l'extraction est dérivée de celle indiquée par ALDERTON et FEVOLD (2), reprise par LOISELEUR (71) dans sa 3ème édition.

- Le liquide est porté à pH = 9, 7 à l'aide de soude N. Son volume total est mesuré.

- Une quantité de NaCl est ajoutée de telle sorte que la concentration totale en NaCl soit de 5 p. 100. On porte au réfrigérateur à 2°C.

En raison de la richesse en polyholosides des globules blancs, une acidification du milieu apparaît au bout de quelques heures et oblige, chaque jour à de nouvelles affusions de soude pour maintenir le pH de 9, 5 à 9, 8.

Après 8 jours à + 2°C, le précipité d'enzymes impures est centrifugé à vitesse modérée (4 à 5000 t/mn).

Le culot est repris par quelques ml d'eau et traité par de l'acide acétique 0, 1 N jusqu'à pH = 4, 5 au potentiomètre.

On porte à nouveau 15 secondes à 100°C.

- On centrifuge à nouveau pour éliminer le restant des protéines acéto-coagulables à chaud et conserve le surnageant. Ce surnageant est ramené à pH = 9, 5 à l'aide de soude et le volume global est à nouveau additionné de 5 p. 100 de NaCl.

Le tout est laissé 4 à 5 jours à + 2°C et à nouveau ramené à pH = 9, 5. Après 24 heures à 2°C, on centrifuge, puis dialyse 3 heures à 18° pour éliminer l'excès de NaCl, sur membrane spéciale Sartorius à l'acétate de cellulose de porosité < 5 µ . Le contenu du dialyseur est ramené à pH = 5, 0 par HCl 0, 01 N. Il est alors desséché dans une cloche à vide garnie de P_2O_5.

Une poudre contenant les enzymes de globules blancs extraits par la précipitation à pH = 9, 5 est conservée au réfrigérateur. Elle donne un seul pic en électrophorèse.

Elle est soumise aux dosages classiques des différentes formes d'azote et à une détermination d'activité lysozymasique sur substrat spécial de DIFCO de germes de M. lysodeikticus tués par les rayons ultraviolets. Cette détermination est faite à 37°C. Elle s'avère positive sans qu'on puisse l'exprimer autrement qu'en activité lysozymasique par rapport à un étalon 3 X cristallisé de lysozyme de blanc d'œuf de poule de G. B. I.

L'activité peut être ainsi rapportée à 10 - 20 % environ de celle du lysozyme étalon.

Par ailleurs, un essai d'activité rattachable à celle de la trypsine sur substrat B. A. E. E. a été entièrement négatif .

Un essai de "cathepsines" sans pouvoir préciser davantage en raison des faibles quantités dont nous disposons sur substrat de caséine selon la technique recommandée par BERGMEYER (13) pour la chymotrypsine à 280 nm a donné :

D. O. blanc : 0
D. O. inconnu : 0, 12.

Ce résultat correspond à une très faible activité protéolytique. Nous pensons donc avoir préparé un extrait enzymatique de globules blancs humains riche en lysozyme.

Discussion :

Notre procédé d'extraction est destiné à des travaux d'applications sur les cobayes et sur la tumeur T8 de GUERIN. Il diffère de celui communiqué par CHARLEMAGNE et JOLLÈS (21) sur les "lysozymes des leucocytes et du plasma d'origine humaine" par les points suivants.

a) Double précipitation acétique à pH = 4, 5 à 100°C pour précipiter complètement les protéines susceptibles de produire les réactions antigéniques.

b) Purification moins poussée que celle conseillée par les auteurs ci-dessus qui recherchaient surtout la comparaison de composition des divers lysozymes de leucocytes de sujets normaux et de sujets leucémiques.

En 1964, JOLLÈS, PETIT, CHARLEMAGNE et JOLLÈS (65) ne possédaient que "quelques milligrammes" de quatre lysozymes d'origine humaine.

c) Une vérification d'absence de protéases agissant sur le substrat B. A. E. E.

2°- Comportement du cobaye après injection de lysozyme de globules blancs normaux humains.

Nous avons réalisé la même expérience pendant que nous recherchions l'antigénicité du lysozyme de blanc d'œuf de poule sur le cobaye.

6 cobayes Evic-ceba de 380 g reçoivent 3 injections sensibilisantes de lysozyme de leucocytes humains 10 mg/kg par voie intrapéritonéale et à 3 jours d'inter - valle.

15 jours après la dernière injection, l'injection intraveineuse déclenchante à 3 mg/kg est réalisée.

La mort des animaux survient au moment marqué d'une croix.

n° des cobayes	*1ère injection*	*2ème injection*	*3ème injection*	*4ème injection (déclenchante)*
1				vivant
2			+	
3		+		
4				mort le 4ème j
5				mort le 5ème j
6			+	

Discussion :

Cette expérience n'est guère plus satisfaisante que celle réalisée avec le lysozyme de blanc d'œuf de poule.

Le lysozyme extrait des globules blancs normaux humains est aussi doué de propriétés antigéniques vis-à-vis du cobaye que celui de l'œuf de poule.

La protéine étrangère a produit les mêmes effets. Il faudrait redouter les mêmes risques si on voulait utiliser ce lysozyme en thérapeutique, bien que, répétons-le, il n'est nullement possible de transposer nos résultats du cobaye à l'Homme.

3°- Action du lysozyme des globules blancs humains sur la tumeur expérimentale T8 de GUERIN.

Nous avons recherché l'action tumoro-statique de notre extrait enzymatique de globules blancs humains riche en lysozyme, sur la croissance de la tumeur T8 de GUERIN. Celle-ci est une néoplasie expérimentale provenant d'un carcinome d'un épithélium de l'endomètre d'une corne utérine de rate, de souche Wistar. La technique utilisée dans le Laboratoire du Professeur Agrégé DELMON, codifiée par plus de 200 passages sur près de 5 000 rats, a conduit à l'obtention d'une croissance tumorale pratiquement stéréotypée. Nous avons pratiqué

deux groupes d'expériences en cinq séries, portant chacune sur dix rats, cinq animaux témoins et cinq animaux traités.

3_1) Procédé par incubation.

a/ Technique :

Elle consiste à mettre en présence, durant un temps défini, un fragment de tumeur T_8 avec le produit. Les greffons doivent tous provenir du même animal pour donner des résultats comparables. La rate donneuse des greffons à incuber est choisie parmi les animaux antérieurement greffés au passage précédent. Cet animal doit posséder une tumeur de volume moyen, non ulcérée, non infectée, et des ganglions métastatiques axillaires, de taille modérée. La zone corticale du ganglion homolatéral est découpée en cubes de 1 mm de côté en évitant de prélever le tissu lymphoïde nécrosé. Les fragments sont placés dans une solution de lysozyme en milieu de HANKS à 37° sur agitateur magnétique pendant deux heures, ce qui permet une bonne imprégnation des cellules néoplasiques par les produits. Nous avons réalisé quatre concentrations de lysozyme, 4 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg/ml, en plaçant pour chacune d'entre elles les fragments témoins correspondants, dans du liquide de HANKS seul. Après incubation, les greffons sont insérés sur le flanc gauche de rates vierges de trois mois d'un poids moyen de 250 g $\pm$ 10 g. La greffe est pratiquée après anesthésie des animaux à l'éther, désinfection du champ opératoire à l'alcool iodé, incision des plans superficiels au ciseau et introduction du fragment tumoral à l'aide d'une fine pince au contact de l'aponévrose externe des muscles droits de l'abdomen. La plaie est refermée par une agrafe de Mitchell. Le prélèvement, l'incubation et l'insertion du greffon doivent être pratiqués avec du matériel stérile et dans des conditions rigoureuses d'asepsie. Ultérieurement, les animaux sont l'objet de mensurations bi-hebdomadaires, portant sur l'établissement d'une courbe du poids de l'animal en fonction de l'absorption alimentaire et d'une courbe de la croissance tumorale appréciée à travers la peau. L'évolution de chaque lot est comparée avec les lots témoins et suivie jusqu'à la mort de l'animal.

b) Résultats :

Les résultats figurent dans le tableau ci-après :

Lots traités / Doses		n° des rats	Prise des greffons	Poids de la tumeur	Lots témoins n° des rats	Prise de la tumeur	Survie	Poids des tumeurs
1ère série	4 mg/ml	3986	-		3981	+ 7è j	48 j	55 g
		87	-		82	+		40
		88	-		83	+		60
		89	-		84	+		30
		90	-		85	+		90
2ème série	10 mg/ml	3775	+	40 g	3755	+ 8è j	34 j	100
		76	-		56	+		45
		77	-		57	+		30
		78	-		58	+		20
		79	-		59	+		40
3ème série	25 mg/ml	3880	+	60 g	3875	+	50 j	65
		81	+	18 g	76	+		51
		82	-		77	+		45
		83	-		78	-		
		84	-		79	-		
4ème série	50 mg/ml	3885	-		3890	+	50 j	35
		86	-		91	+		40
		87	-		92	+		65
		88	-		93	+		20
		89	-					
Nombre total d'animaux		20	3 + 17 -		19	17 + 2 -		

Commentaires :

- Sur 19 animaux témoins, 2 greffons n'ont pas pris (10 p. 100 de non prise),
- Sur 20 animaux traités, 3 prises, donc pour les 17 autres, absence de prise (85 p. 100 de non prise).

Parmi les animaux non protégés par le traitement, il n'est pas noté de différence significative entre les poids tumoraux de ces 3 animaux par rapport au poids moyen des tumeurs des lots témoins.

3_2) Procédé par injection.

Cette technique n'a été conduite que sur cinq animaux. Elle a consisté à injecter quatre jours après la greffe par voie sous-cutanée, et pendant deux semaines à raison d'une injection par jour, 2, 5 mg de lysozyme dans un ml de sérum physiologique par animal.

Résultats :

METHODE PAR INJECTION

Traitement 2,5 mg/j x 15 j	*n° des rats*	*Prise des greffons*	*Survie 48 j.*	*Au bout de 48 j., poids des tumeurs*
	3991	-	"	12 g
	92	-	"	25 g
	93	- sous traitement	"	10 g
	94	- puis démarrage progressif	"	30 g
	95	-	"	15 g
Témoins	5981	+	"	55 g
	82	+ id.	"	40 g
	83	+	"	60 g
	84	+	"	30 g
	85	+	"	90 g

Commentaire :

Il semble qu'il y ait eu retard de la croissance du greffon pendant la durée des injections. A l'arrêt du traitement et dans un délai plus long que chez les témoins, les cinq greffons ont démarré pour aboutir à un volume moyen environ de la moitié du volume des témoins.

Le poids moyen des tumeurs des animaux traités (18, 4 g) est le tiers du poids des tumeurs des animaux témoins (55 g).

Conclusion :

Notre lysozyme extrait des globules blancs normaux humains a permis deux constatations d'effet tumorostatique vis-à-vis de la tumeur T_8 de GUERIN.

a) Par incubation :

85 p. 100 de non prise des greffons pour les animaux traités;
10 p. 100 de non prise des greffons pour les animaux non traités.

b) Par injection :

Il y a retard de la prise des greffons, puis au bout du même temps, soit 48 jours, on relève les poids suivants :

Poids moyen des tumeurs : 18, 4 g pour les traités,
55 g pour les témoins.

Nous relatons simplement ces expériences uniquement pour apporter notre contribution à un rôle possible des enzymes des polynucléaires - et du lysozyme notamment - dans le rejet des tumeurs greffées.

Nous nous garderons bien, pour le moment, de proposer d'autres applications.

*

CONCLUSIONS DU CHAPITRE VI

Nous avons extrait des enzymes de globules blancs humains normaux et par thermocoagulation des protéines étrangères, conservé la fraction lysozymasique.

Cette fraction a une activité de 10 à 20 p. 100 environ de celle du chlorhydrate de lysozyme de blanc d'œuf cristallisé.

1°- Une expérience d'antigénicité sur 6 cobayes a été réalisée dans les mêmes conditions (10 mg/kg) qu'avec le lysozyme de l'œuf.

Les résultats ont été aussi mauvais, 5 animaux sont morts sur 6.

2°- Une expérience d'effet tumoro-statique de notre extrait lysozymasique sur la tumeur greffée T_8 de GUERIN a montré :

a) Par incubation des greffons :
animaux traités : 85 p. 100 de non prise,
non traités : 10 p. 100 de non prise.

b) Par injection, poids moyen des tumeurs après 48 jours:
pour les animaux traités, ce poids n'est que le tiers de celui des témoins.

Il semble y avoir effet tumoro-statique net du lysozyme des leucocytes normaux humains sur la tumeur expérimentale T_8 de GUERIN.

CHAPITRE VII

LYSOZYMES VEGETAUX

*

I - EXTRACTION DE LA FRACTION LYSOZYME DE LA PAPAINE INDUSTRIELLE.

Dans ce chapitre, c'est un essai d'extraction d'un lysozyme pouvant remplacer celui d'œuf de poule qui nous a guidé.

Nous nous sommes inspirés du travail de MEYER, HAHNEL et STEINBERG (78) pour extraire la fraction lysozymasique de la papaine.

Notre matériau de départ a été le suc récemment desséché de papayer de l'Afrique tropicale de provenance vraisemblablement du Tanganyika. Cette papaïne "officinale" selon le Codex de 1949 (puisque la monographie de la papaïne a été réservée dans l'édition de 1965), titre 400 unités en fibrine de porc humide calculée d'après le poids de l'extrait sec résultant de la fibrinolyse.

Cette papaïne est finement broyée, tamisée, puis dissoute à 25°C dans le minimum d'eau distillée.

La solution est passée à travers un filtre type CHAMBERLAND et lyophilisée. On obtient ainsi une papaïne blanche, d'odeur agréable et fruitée, complètement hydrosoluble, ne laissant après dissolution aucun résidu et titrant encore 380 unités selon le Codex de 1949.

Cette papaïne sera remise en solution voisine de la saturation 1 g dans 7 g d'eau distillée à 20°C soit à la concentration de 14, 5 p. 100.

Elle servira aux essais d'extraction du lysozyme.

Nous avons essayé les procédés d'extraction déjà mentionnés pour la préparation du lysozyme du blanc d'œuf, puis par précipitation méthanolique.

a) Adsorption sur l'alumine de CAMAG, puis sur bentonite. L'adsorption de la fraction présumée lysozyme de notre solution saturée à froid de papaïne a été réalisée à 20° au moyen de 250 mg d'adsorbant par ml de solution. Après 12 heures, le tout a été centrifugé, puis lavé 3 fois de suite avec 3 ml d'eau distillée chaque fois, puis séché sous cloche à vide.

L'élution a été pratiquée à pH = 7, 0 avec de la pyridine seule, puis par du sulfate de pyridinium de pH= 4, 0. Après élimination sous vide de la pyridine éluante, un essai a été pratiqué sur M. lysodeikticus. Il s'est avéré très faible.

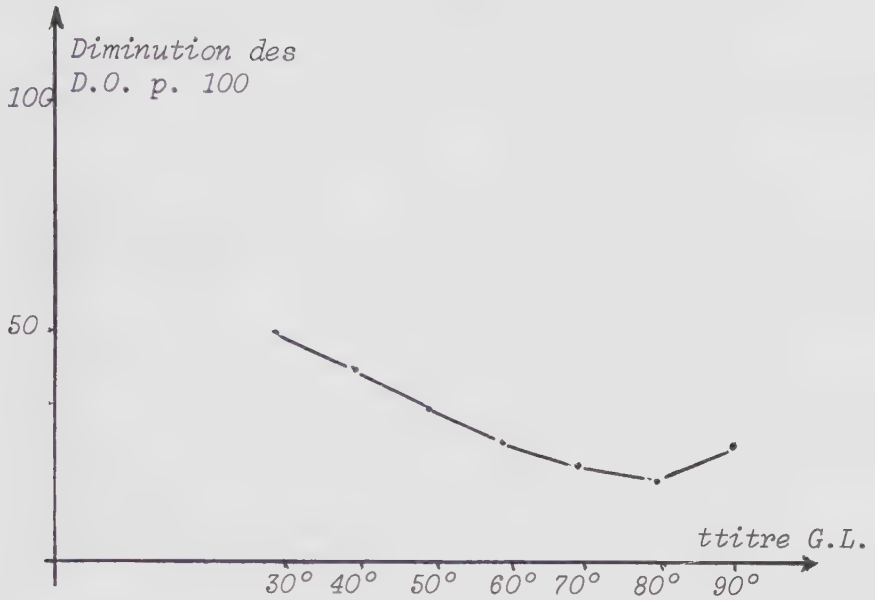
Le départ complet de la pyridine est d'ailleurs très difficile.

b) Adsorption selon la technique de MEYER avec l'hydrate $Pb(OH)_2$. Cette technique a été ébandonnée par suite d'un début de noircissement par formation de sulfure de plomb.

c) Précipitation méthanolique. Nous sommes partis d'un méthanol titrant 99, 5 p. 100 de CH_3OH et nous avons ajouté à notre solution concentrée saturée à 14, 5 p. 100 de papaïne des quantités croissantes de méthanol, de telle sorte que la concentration finale en méthanol atteigne 30, 40, 50, 66, 75, 80, 85, 90, 95 p. 100 de l'ensemble.

Des précipitations de l'enzyme se produisent, variables d'après la diminution de la densité. On laisse 12 heures au repos à 20°. Les précipités sont centrifugés, séchés sous vide, puis à poids égal de 1 mg/ml essayés sur le substrat de M. lysodeikticus dans les conditions du dosage turbidimétrique par comparaison.

La courbe des diminutions de D. O. en 30 mn à 25°C à 540 nm est la suivante en fonction du titre alcoolique :



COURBE n° XIV - *DIMINUTION DES D.O. EN FONCTION DU TITRE ALCOOLIQUE.*

N.B. - L'activité est maximum aux environs de 80°GL.

La fraction précipitée par le méthanol à 80 p. 100 a été retenue. Elle a été reprise par de l'eau distillée : 1 g dans 8 ml d'eau, puis soumise à une seconde précipitation dans le méthanol à un titre, après mélange, de 80 p. 100. Traité comme précédemment, ce précipité séché a été essayé.

Ce second extrait s'est montré de 15 à 20 p. 100 plus actif que le premier. Son examen électrophorétique sur cellogel, comparé à celui d'un chlorhydrate de lysozyme cristallisé et frais d'œuf de poule a montré que sa pureté ne dépassait pas 90 p. 100 après passage au densitomètre.

Son titre lysozymasique par rapport à celui du blanc d'œuf de poule a été seulement de 30 p. 100 environ.

En outre, il a présenté une activité protéasique nette sur B. A. E. E.

De ce fait, nous n'avons pas étudié son antigénicité sur le cobaye et il ne pourrait être utilisé que par voie orale.

Discussion :

Notre extrait lysozymasique de papaïne commerciale peut être préparé en grande quantité. Sa préparation est différente de celles préconisées par GRASS - MANN (44), puis par MEYER, HAHNEL et STEINBERG (78) enfin par HOWARD et GLAZER (49).

Le premier auteur recherchait quels pouvaient être les activateurs de la papaïne, les seconds cherchaient à obtenir un lysozyme végétal comparable à celui de l'œuf de poule, mais tous n'en ont obtenu que de faibles quantités.

Tel n'était pas notre but. On peut préparer industriellement une fraction lysozymasique à partir de la papaïne, mais son utilisation ne pourrait être qu'orale.

II - ESSAI D'EXTRACTION DE LA FRACTION LYSOZYME DE LA FICINE COMMERCIALE.

Nous avons utilisé deux échantillons de ficine de MERCK provenant vraisemblablement de Ficus glabrata (Moracée).

Les ficines commerciales présentent les caractères suivants :

a) Ficine entièrement hydrosoluble titrant 3, 9 unités ANSON au mg - Titrage sur hémoglobine à pH = 8, 0 et à 35°5 C.

b) Ficine purifiée incomplètement hydrosoluble à 4 p. 100 de résidu et de même titrage.

Leur PM est de 26 000 environ.

Nous avons tenté des concentrations par adsorption sur alumine et sur bentonite, puis une précipitation méthanolique de solutions aqueuses jusqu'à un titre de 80 p. 100 en méthanol.

La dessiccation des précipités a été très laborieuse mais nous avons obtenu toutefois une fraction protéique présentant pratiquement un seul pic à l'électrophorèse en tampon de pH = 6, 0.

Essayées sur M. lysodeikticus, à pH = 5, 0, les deux fractions présumées lysozymasiques des deux échantillons de ficine n'ont montré aucune activité vis-à-vis du germe réactif.

Discussion :

Nos deux préparations sont beaucoup moins pures que celles décrites par GLAZER et coll. (40) en 1969. Ces auteurs partent de latex frais et adsorbent le lysozyme successivement sur Cellex, Amberlite IRC 50, enfin sur Sephadex. C'est par ce procédé qu'ils ont pu préciser l'activité comparée des lysozymes de ficus, papayer et blanc d'œuf de poule, résumée dans le tableau ci-après :

	Lysozyme de ficus	*Lysozyme de papayer*	*Lysozyme de blanc d'oeuf de poule*
Optimum de pH sur M.lysodeikticus	4,5 à 4,7	4,5 à 4,7	5,0 à 7,0
Activité sur M.lysodeikticus	0,85 ± 0,05	0,35 ± 0,05	1

Remarquons comme pour la papaïne, qu'il s'agit ici d'extractions en vue de travaux de laboratoire.

Nous avions espéré pouvoir extraire un lysozyme végétal de ficus, mais avec les poudres de Ficine commerciales nous n'avons pu y parvenir.

C'est certainement sur du latex frais qu'il faut opérer et non sur des latex desséchés.

III - ESSAI D'EXTRACTION D'UNE FRACTION LYSOZYME, DE FRUITS FRAIS D'ANANAS.

WILLSTAETTER et GRASSMANN (112) ont depuis longtemps concentré une activité protéasique dans le jus frais d'ananas par fractionnement classique au sulfate d'ammonium à saturation à 0°, puis par précipitation à l'alcool éthylique à 80°GL.

La protéase appelée bromeline est apparentée à la papaïne, selon BAMANN et MYRBÄCK (11).

Il y aurait une différence de stabilité : la broméline subsisterait dans le jus au cours de la maturation du fruit alors que la papaïne disparaît.

Nous avons essayé de déterminer une activité lysozymasique du jus frais d'ananas de mars, avril et mai.

L'activité sur M. lysodeikticus a été nulle.

Il ne semble pas que le jus frais de l'ananas présente quelqu'intérêt comme source de lysozyme végétal, du moins pour en obtenir de grandes quantités.

*

CONCLUSIONS DU CHAPITRE VII

Des trois sources de lysozymes végétaux envisagées, nous avons obtenu les résultats suivants :

1°- La papaïne industrielle, traitée par précipitations méthanoliques à 80°GL peut permettre la production d'une fraction d'activité lysozymasique importante. Cependant, elle ne serait utilisable pour le moment que par voie orale.

2°- Les ficines industrielles que nous avons étudiées n'ont montré aucune activité lysozymasique. Seuls les latex frais pourraient convenir .

3°- Les jus d'ananas frais de printemps que nous avons analysés étaient dépourvus de toute activité lysozymasique.

CONCLUSIONS GENERALES

*

Dans notre introduction, nous précisons que le but que nous nous sommes assigné concerne l'étude du lysozyme destiné à l'usage pharmaceutique. Depuis une quinzaine d'années en effet, plus de dix médicaments sont à base ou contiennent du lysozyme.

Dans la première partie, nous rappelons les travaux antérieurs concernant surtout le dosage du lysozyme, le problème des substrats et sa nouvelle spécification de "muramidase", abréviation de "N acétyl muramide glycano-hydrolase". Bien que souhaitable, cette appellation n'est pas admise par tous en raison précisément de divergences quant à la proposition d'un choix d'un substrat hydrosoluble reproductible.

Dans la deuxième partie, qui concerne nos recherches expérimentales personnelles, nous envisageons plusieurs chapitres.

Le premier chapitre est une contribution aux dosages du lysozyme. La turbidimétrie de M. lysodeikticus demeure la méthode la plus largement employée, mais nous apportons des précisions quant à sa réalisation. Après avoir choisi les principaux facteurs influençant la réaction enzymatique, nous insistons bien sur les deux possibilités d'expression des résultats :

- soit en unités d'activité enzymatique mesurée à la fin de la première minute, à 37°C et en tampon phosphates $\frac{M}{15}$ de pH = 7, 0, lecture à 450 nm.

- soit en pourcentage par rapport à un étalon de chlorhydrate de lysozyme cristallisé.

Nous proposons aussi la méthode réductimétrique et la méthode diffusimétrique pour le dosage du lysozyme dans des préparations pharmaceutiques complexes.

Le second chapitre traite de la photodestruction du lysozyme en solution, démontrée en lumière solaire et en lumière ultraviolette.

Cette constatation entraîne l'obligation de ne pas préparer de solutions de lysozyme à l'avance et de les conserver à l'obscurité.

La préparation d'un lysozyme iodé à une concentration en halogène inférieure à 1 p. 100 a été réalisée.

L'inactivation est faible au début, mais s'accroît avec le temps. L'emploi thérapeutique destiné à l'O. R. L. a été abandonné.

Le troisième chapitre concerne la thermorésistance du lysozyme due vraisemblablement à son bas poids moléculaire. Un rappel de constatations similaires sur d'autres enzymes est également mentionné.

Une conséquence à portée industrielle en est déduite. Alors que les poudres d'œufs industrielles ne conservent plus leur activité lysozymasique, une dessiccation à 50°C et même à 80°C sous vide de 5 mm de mercure, altère partiellement le lysozyme. Mais la conservation est meilleure par addition de 1 p. 100 de glycine.

Le quatrième chapitre étudie le devenir du lysozyme utilisé par voie orale.

Le problème de sa dialyse est tout d'abord confirmé. De bas poids moléculaire, l'enzyme dialyse assez facilement selon la porosité des membranes.

L'action des principales enzymes digestives est étudiée. La pepsine inactive rapidement le lysozyme à de faibles concentrations, et pour un transit stomacal

normal et rapide. Il faut des concentrations de lysozymes assez élevées pour éviter l'inactivation ou avoir recours à une protection des médicaments uniquement libérables dans l'intestin. La trypsine et la pancréatine n'inhibent pas le lysozyme.

Les antibiotiques naphtacéniques et macrolides n'altèrent pas le lysozyme mais semblent au contraire le protéger de l'inactivation pepsique.

Les "ferments" lactiques ne perturbent pas l'activité du lysozyme qui, par ailleurs, est doué d'une propriété fungistatique certaine notamment vis-à-vis des espèces du groupe des Candida. Une lysozymémie accrue est démontrée par passage in vivo d'une forte dose de lysozyme du tube digestif au sang du chien.

Le cinquième chapitre concerne l'emploi du lysozyme par la voie injectable, intra-musculaire en général.

Une démonstration de réaction antigénique est faite par des expériences de sensibilisation de cobayes : 85 p. 100 des animaux meurent des suites de réactions déclenchantes.

Le risque de l'antigénicité, la présence de substances antihistaminiques dans certains lysozymes médicamenteux est évoquée.

Le sixième chapitre expose une extraction de lysozyme de globules blancs humains normaux.

L'enzyme essayée sur des cobayes a montré une réaction antigène-anticorps aussi intense qu'avec le lysozyme du blanc d'œuf de poule. Les réactions de sensibilisation, puis la réaction déclenchante ont donné le même pourcentage de morts.

Par contre, en rappelant que les globules blancs sont responsables du rejet des greffes d'organes, une carcinostase de la tumeur T8 de GUERIN par le lysozyme de globules blancs a été prouvée de façon satisfaisante.

Le dernier chapitre traite des fractions lysozymasiques de végétaux. Seule la papaïne industrielle permet d'envisager une extraction d'une fraction lysozymasique active.

L'antigénicité de cette fraction n'a pas été essayée chez le cobaye car elle contient encore une protéase active sur B. A. E. E.

Le problème du remplacement du lysozyme de blanc d'œuf par des lysozymes d'autres sources moins antigéniques n'a conduit qu'à des résultats très partiels.

B I B L I O G R A P H I E

1 - ABRAHAM (E.P.) -
Some properties of egg-white lysozyme.
Biochem. J., 1939, 33, 622-30.

2 - ALDERTON (G.), FEVOLD (H.L.) -
Direct crystallisation of lysozyme from egg-white and some crystalline salts of lysozyme.
J. Biol. Chem., 1946, 164, 1 - 4.

3 - ALDERTON (G.), WARD (W.H.), FEVOLD (H.L.) -
Isolation of lysozyme from egg-white.
J. Biol. Chem., 1945, 157, 43-58.

4 - ALLERHAND (J.), REDONDO (F.), MIZRAHI (A.) -
Comparative study of different technics for the determination of muramidase (lysozyme).
Clin. Chem., 1966, 12, 8, 531.

5 - AMINOFF (D.), MORGAN (W.T.J.), WATKINS (W.M.) -
Studies on immunochemistry. The action of dilute alcali on the N-acetylhexosamine and the specific blood group mucoids.
Biochem. J., 1952, 51, 379-89.

6 - AUDIFFREN (P.), VANDEKERKOVE (M.), FAUCON (R.), NICOLI (J.) -

Demasquage du substrat du lysozyme chez Neisseria meningitidis.
C.R. Soc. Biol., 1967, 161, 2, 394-6.

7 - BABIN (P.) -
La dihydrostreptomycine et la réaction d'Elson et Morgan.
Bull. Soc. Pharm., Bordeaux, 25.11.1970 , 1971, sous presse.

8 - BABIN (Ph.) -
Activité lysozymasique du sérum sanguin humain normal et cancéreux.
Afas, Bordeaux Med., 1968, 12, 2437-8.

9 - BABIN (Ph.), DELMON (G.), BABIN (P.) -
Action d'un extrait enzymatique de globules blancs humains sur la tumeur Tg de Guerin.
Bull. Soc. Ph., Bordeaux, 1971 (30.6.71).

10 - BALEKJIAN (A.Y.), HOERMAN (K.C.), BERZINSKAS (V.J.) -
Lysozyme of human parotid gland secretion : purification and physico-chemical properties.
Biochim. Biophys. Res. Comm., 1969, 35, 887-94.

11 - BAMANN (E.), MYRBÄCK (K.) -
Die Methoden der Fermentforschung.
3 vol. Thieme - Leipzig, 1941.

12 - BARBU (E.), RAMPINI (C.) -
Le lysozyme des phages.
Exp. Ann. Bioch. Med., 27° Série - Masson, 1966, 89-100.

13 - BERGMEYER (H.U.) -
Methods of enzymatic analysis.
1 vol. Acad. Press., 1965.

14 - BOAS (N.F.) -
Method for the determination of hexosamine in tissues.
J. Biol. Chem., 1953, 204, 553-63.

15 - BONAVIDA (B.), SAPSE (A.T.) -
Human tear lysozyme.
Amer. J. ophtalm., 1968, 66, 1, 70-5.

16 - BOULANGER (P.), POLONOVSKI (J.), TAYEAU (F.), MANDEL (P.), BISERTE (G.) -
Biochimie Medicale 3 vol. Masson, 1968-9.

17 - BOYER (P.D.), LARDY (H.), MYRBÄCK (K.) -
The enzymes. Acad. Press. 8 vol., 1960.
T. IV , ch. 25 - Lysozyme by JOLLÈS (P.), 431-445.

18 - BROWN (J.R.) -
Disulphide bridges of lysozyme.
Biochem. J., 1964, 92, 13 P.

19 - CANFIELD(R.E.) - Peptides derived from tryptic digestion of egg-white lysozyme.
J. Biol. Chem., 1963, 238, 8, 2691-7.

20 - CANFIELD (R.E.), ANFINSEN (C.B.) -
Chromatography of pepsin and chymotrypsin digests of egg-white lysozyme on phosphocellulose.
J. Biol. Chem., 1963, 238, 8, 2684-90.

21 - CHARLEMAGNE (D.), JOLLÈS (F.) -
Les lysozymes des leucocytes et du plasma d'origine humaine.
Nouv. Rev. Franç. Hematol., 1966, 6, 3, 355-66.

22 - CHARLEMAGNE (D.), JOLLÈS (P.) -
La spécificité de divers lysozymes vis-à-vis de substrats de faible poids moléculaire provenant de la chitine.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1967, 49, 8-9, 1103-13.

23 - COLOBERT (L.) -
Action du lysozyme sur les bactéries à gram positif.
Exp. Ann. Bioch. Med., 27° série , Masson, 1966, 63-84.

24 - COLOBERT (L.), DIRHEIMER (G.) -
Action du lysozyme sur un substrat glycopeptidique isolé de M. lysodeikticus.
Biochem. Biophys. Acta., 1961, 54, 3, 455-68.

25 - COLOBERT (L.), DIRHEIMER (G.) -
Le dosage de l'activité enzymatique du lysozyme.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 141-7.

26 - COLOWICK (S.P.), KAPLAN (N.O.) -
Methods in Enzymology.
16 vol. Acad. Press, 1955 à 1970.

27 - COREY (R.B.), DONOHUE (J.), TRUEBLOOD (K.N.) -
An X ray investigation of air-dried lysozyme chloride crystals. The three dimensional Patterson Function.
Acta Crystall., 1952, 5, 701-710.

28 - DENIS (P.) -
Préparations catalasiques - Etude de quelques agents d'inhibition.
Thèse Doc. Pharm. Un. Bordeaux, 1968, Bergeret Imp.

29 - DIRHEIMER (G.) -
Isolement et analyse d'un substrat soluble du lysozyme à partir de Micrococcus lysodeikticus et contribution à l'étude de l'action du lysozyme sur ce substrat.
Thèse Doc. Pharm. Et., Strasbourg, 1961, n° 17.

30 - DIXON (M.), WEBB (E.G.) -
Enzymes, 1 vol. Longmans, 1962-1964.

31 - DUBOIS-PREVOST (R.) -
Le lysozyme de FLEMING.
Tome 1, 1969.
Ed. Le François, Paris.

32 - ELSON (L.A.), MORGAN (W.T.J.) -
Colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine.
Biochem. J., 1933, 27, 1824-8.

33 - FAUST (E.C.), THOMEN (L.P.) -
Parasiticidal properties of the proteolytic enzyme ficin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1941, 47, 485-7.

34 - FLEMING (A.) -
On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions.
Proc. Roy. Soc. London, B., 1922, 93, 306-317.

35 - FLEMING (A.), ALLISON (J.) -
A bacteriolytic substance (lysozyme) found in secretions and tissues.
British. J. Exp. Pathol., 1922, 3, 252-260.

36 - FRAENKEL-CONRAT (H.) -
The essential groups of lysozyme with particular reference to its reaction with iodine.
Arch. Bioch. Biophys., 1950, 27, 109-124.

37 - GAJDOS (A.) -
Biochimie des lysozymes.
Presse Med., 1971, 79, 8, 351-4.

38 - GHUYSEN (J.M.), TIPPER (D.J.), STROMINGER (J.L.) -
Enzymes that degrade bacterial cell walls.
in Colowick-Kaplan T. VIII, 685-99.

39 - GIRARD (J.P.) -
Propriétés anti-anaphylactiques du 9 (N methyl-piperidyliden 4') thioxanthène (B.P. 400) et du lysozyme comparées à celles de la prednisone.
Med. Exp., 1963, 9-6, 400-408.

40 - GLAZER (A.N.), BAREL (A.O.), HOWARD (J.B.), BROWN (D.M.) -
Isolation and characterization of fig lysozyme.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 13, 3583-89.

41 - GLYNN (A.A.) -
Rôle et répartition du lysozyme intra-cellulaire et extra-cellulaire.
Exp. Ann. Bioch. Med., 27° série, 1966, 116-128.

42 - GONÇALVES (J.M.), MOLINARI (R.), DEUTSCH (H.F.) -
Chromatographic and immunochemical studies on lysozyme.
Arch. Biochem. Biophys., 1956, 60, 171-9.

43 - GORINI (L.), FELIX (F.), FROMAGEOT (C.) -
Influence du manganèse sur la stabilité du lysozyme. Rôle protecteur du manganèse lors de l'hydrolyse du lysozyme par la trypsine.
Biochim. Biophys. Acta, 1953, 12, 283-8.

44 - GRASSMANN (W.) -
Zur kenntnis des naturlichen Papaïn-Aktivators.
Biochem-Zeitschr., 1935, 279, 131-6.

45 - HANNOUZ (M.) -
Antigénicité et pureté d'une préparation de lysozyme.
Path. Microbiol., Suisse, 1965, 28, 1, 139-147.

46 - HARA (S.), MATSUSCHIMA (Y.) -
Studies on the substrate specificity of egg-white lysozyme.
J. Biochem., 1967, 62, 1, 118-25.

47 - HARTDEGEN (F.I.), RUPLEY (J.A.) -
Inactivation of lysozyme by iodine oxidation of a single tryptophan.
Biochem. Biophys. Acta, 1964, 92, 635-37.

48 - HARTSELL (S.E.) -
Lysozyme activity of rehydrated spray-dried whole egg powder.
Food Research., 1948, 13, 136-142.

49 - HOWARD (J.B.), GLAZER (A.N.) -
Papaya lysozyme.
J. of Biol. Chem., 1969, 244, 6, 1399-1409.

50 - IKAN (R.) -
Natural products laboratory guid.
1 vol. Acad. Press. , 1969.

51 - IMOTO (T.), HAYASHI (K.), FUNATSU (M.) -
Characterization of enzyme-substrate complex of lysozyme.
J. Biochem., 1968, 64, 3, 387-92.

52 - JACOB (A.), JORRE (J.), VIKRAL (N.), PALOU (A.), THELIER (J.) -

Dosage du lysozyme par une méthode de diffusion.
Ann. Pharm. Fr., 1964, 22, 4, 301-306.

53 - JAVILLIER (M.), POLONOVSKI (M.), FLORKIN (M.), BOULANGER (P.), LEMOIGNE (M.), ROCHE (J.), WURMSER (R.) -
Traité de Biochimie Générale, 6 vol. Masson, 1959-69.

54 - JEANLOZ (R.W.) -
Etude de la structure chimique de la paroi bactérienne et l'action du lysozyme sur cette structure.
Med. et Hygiène, 1964, n° 662, 966 - 7.

55 - JEANLOZ (R.W.) -
Substrat du lysozyme - Structure chimique.
Exp. Ann. Biochim. Med., 27° série 1966, 45-63.

56 - JEANLOZ (R.W.), SHARON (N.), FLOWERS (H.M.) -
The chemical structure of disaccharide isolated from M. lysodeikticus cell walls.
Biochem. Biophy. Res. Comm., 1963, 13, 20-5.

57 - JOHNSON (L.N.) -
The three dimensional structure of hen egg white lysozyme.
Exp. Ann. Biochim. Med., 27° série 1966, 31-33.

58 - JOLLÈS (P.) -
Lysozyme in BOYER, LARDY, MYRBÄCK.
T. IV., 431-445.

59 - JOLLÈS (P.) -
Lysozymes from rabbit spleen and dog spleen.
Methods in Enzymology - COLOWICK-KAPLAN.
1962, vol. 5, 137-40.

60 - JOLLÈS (P.) -
Chimie et Biochimie des lysozymes.
Exp. Ann. Bioch. Med., 27° série, 1966, 1-30.

61 - JOLLÈS (P.), CHARLEMAGNE (D.), PETIT (J.F.), MAIRE (A.C.), JOLLES (J.) -
Biochimie comparée des lysozymes.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 12, 2241-59.

62 - JOLLÈS (G.), FROMAGEOT (C.) -
Isolement de protéines lysantes de la rate de lapin.
Biochim. Biophys. Acta, 1953, 11, 95-101.
Biochim. Biophys. Acta, 1954, 14, 219-227.

63 - JOLLÈS (G.), JOLLÈS (P.) -
Isolement et caractérisation d'un facteur antihistaminique présent dans certains lots de lysozyme.
Bull. Soc. Chim. Fr., 1965, 11, 3300-01.

64 - JOLLÈS (P.), LEDIEU (M.), ZUILI (S.) -
Comparative study of some lysozymes.
Symposium su lisozima, n° 1, Milan, 1959, 11.

65 - JOLLÈS (P.), PETIT (J.F.), CHARLEMAGNE (D.), JOLLÈS (J.) -
Etude comparée de quatre lysozymes d'origine humaine.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 1, 189.

66 - KAGRAMANOVA (K.A.), ERMOL'EVA (Z.) -
Caractéristiques comparées des procédés de détermination de l'activité du lysozyme.
Antibiotiki SSRR., 1966, 11, n° 10, 917-19.

67 - KING (G.S.D.) -
PreliminaryXray investigation of some lysozymes.
Acta crystall., 1954, 7, 653-658.

68 - KRAVCHENKO (N.A.), KAGRAMANOVA (K.A.), KUZNETOV (Y.D.)
Effect of salts and other factors on lysozyme activity.
Biokhimija, 1967, 3, 618-23.

69 - LASCHTSCHENKO (P.) -
Ueber die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung von Hühnereiweiss.
Z. Hyg. Infek Krankheiten, 1909, 64, 419-427.

70 - LESOBRE (R.), AUBIN-HESSE(H.) -
L'association propionyl-erythromycine-tetracycline lysozyme dans le traitement des affections bronchiques et pulmonaires.

Presse Méd., 31 déc. 1966, n° 36, 2935-6.

71 - LOISELEUR (J.) -
Techniques de Laboratoire. 3 vol., Masson, 3ème Ed., 1963.

72 - LOWE (G.), SHEPPARD (G.) -
Acetamido-group participation in Lysozyme catalysis.
Chem. Comm., 1968, 9, 529-30.

73 - LUVONI (R.) -
Due casi mortali da prima iniczione intramuscolare di lisozima.
Minerva med. leg. Ital., 1963, 83, 5, 130-4.

74 - MAKSIMOV (V.I.), KAVERZNEVA (E.D.), KRAVCHENKO (N.A.)
On the mode of lysozyme action upon the oligosaccharide fragments of chitin.
Biokhimija SSRR., 1965, 30, 1007-1014.

75 - MAKSIMOV (V.I.), TEPELINA (O.M.) -
La chitodextrine en tant que substrat et inducteur dans la réaction du lysozyme avec les oligosides.
Biokhimija SSRR, 1966, 31, 5, 918-23.

76 - MALANGEAU (P.) -
Médicaments actuels et médicaments à venir.
Labo Pharma., n° 198, 1971, 59-60.

77 - MEYER (K.), HAHNEL (E.) -
The estimation of lysozyme by a viscosimetric method.
J. Biol. Chem., 1946, 163, 723-32.

78 - MEYER (K.), HAHNEL (E.), STEINBERG (A.) -
Lysozym of plant origin.
J. Biol. Chem., 1946, 163, 733-40.

79 - MEYER (K.), PALMER (J.W.), THOMPSON (R.), KHORAZO (P.) -
On the mechanism of lysozym action.
J. Biol. Chem., 1936, 113, 479-86.

80 - MEYER (K.), THOMPSON (R.), PALMER (J.), KHORAZO (D.)
The purification and properties of lysozyme.
J. Biol. Chem., 1936, 113, 303-9.

81 - MOCHAYEDI (B.) -
Action des enzymes de la Rue au cours de l'extraction du Rutoside.
Mémoire p. le titre d'Assistant Etranger, Bordeaux, 1962, Imp. Drouillard.

82 - MORGAN (W.T.J.), ELSON (L.A.) -
A colorimetric method for the determination of N acetyl glucosamine and N acetylchondrosamine.
Biochem. J., 1934, 28, 1, 988-995.

83 - NICHOL (L.W.), OGSTON (A.G.), WINZOR (D.J.) -
Evaluation of gel filtration data on systems interacting chemically and physically.
Arch. of Biochem. and Biophys., 1967, 121, 517-21.

84 - NICOLLE (M.) -
Action du Bacillus subtilis sur diverses bactéries.
Ann. Inst. Pasteur, 1907, 21, 613-21.

85 - NIEMANN (B.) -
Contribution à l'étude comparée des lysozymes.
Thèse Doc. Pharm. Un. Paris, 1967 - 1968, n° 456.

86 - NORTHROP (J.H.) -
In BAMANN (E.), MYRBÄCK (K.) , p. 2034.
voir aussi in DIXON & WEBB , p. 53.

87 - NORTHROP (J.H.), KUNITZ (M.), HERRIOTT (R.M.) -
Crystalline Enzymes.
1 vol. Columb. Univ. Press. Ed., 1948-55.

88 - OHNUMA (T.), HOLLAND (J.F.), FREEMAN (A.), SINKS (L.F.)
Biochemical and Pharmacological studies with asparaginase in Man.
Cancer research, 1970, 2297-2305.

89 - ORFILA (J.), RAMPINI (C.) -
Quelques aspects des variations physiopathologiques du lysozyme.
Exp. Ann. Bioch. Med., 27° série, 1966, 154-9.

90 - OSAWA (T.), NAKAZAWA (Y.) -
Lysozyme substrates.
Biochem. Biophys. Acta, 1966, 130, 1, 56-63.

91 - PARROT (J.L.), NICOT (G.), CANU (P.) -
Inhibition du bronchospasme histaminique par le lysozyme.
J. Physiol. Fr., 1963, 55, 2, 363-4.

92 - PEREZ (J.J.) -
Préparations pratiques des protéines.
in Loiseleur T II, Lysozyme cristallisé, p. 1057.

93 - PESEZ (M.), POIRIER (P.), BARTOS (J.) -
Pratique de l'analyse organique colorimétrique.
1 vol. Masson, 1966, p. 146.

94 - PIFFAULT (C.), LACHAPELE (A.P.), BLANQUET (P.), BABIN (R.) -
Action des radiations sur l'eau bidistillée.
J. Radiol. Electrol., 1953, 34, 824-6.

95 - PISZKIEWICZ (D.), BRUICE (T.C.) -
Glycoside hydrolysis.
J. Amer. Chem. Soc., 1968, 90, 8, 2156-63.

96 - REISSIG (J.L.), STROMINGER (J.L.), LELOIR (L.F.) -
A modified colorimetric method for the estimation of the acetylamino sugars.
J. Biol. Chem., 1955, 217, 959-66.

97 - SCHUTTE (E.), KRISCH (K.) -
Ueber die Darstellung und Eigenschaften des sogenannten lysozym substrates.
Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem., 1958, 311-312, 121-30.

98 - SCHWERT (G.W.), EISENBERG (M.A.) -
The kinetics of amidase and esterase activity of trypsin.
J. Biol. Chem., 1949, 179, 665-72.

99 - SHARON (N.), JOLLÈS (J.), JOLLÈS (P.) -
Contribution à l'étude du mécanisme d'action de lysozymes d'origines diverses.
Bull. Soc. Ch. Biol., 1966, 48, 5, 731-2.

100 - SHUGAR (D.) -
The measurement of lysozyme activity and the ultra violet inactivation of lysozyme.

Biochim. Biophys. Acta, 1952, 8, 302-10.

101 - SKUKLA (O.P.), KRISHNA MURTI (C.R.) -
Activité bactériolytique de latex végétaux.
J. Sc. indus. Res. India, 1961, 20, 225-6.

102 - SMOLELIS (A.N.), HARTSELL (S.E.) -
The determination of lysozyme.
J. Bacteriol., 1948, 58, 731-36.

103 - SMOLELIS (A.N.), HARTSELL (S.E.) -
Factors affecting the lyting activity of lysozyme.
J. Bacteriol., 1952, 63, 665-674.

104 - SOODAK (M.) -
Acetylation of D glucosamine by Pigeon liver extracts.
in COLOWICK, KAPLAN T. 1. 612-625.

105 - SOLENTE (G.) -
Choc grave avec oedème de Quincke par injection I.M. de lysozyme.
Bull. Soc. Fr. Derm. Syphil., 1961, 68, 3, 378-9.

106 - SUMNER (J.B.), MYRBÄCK (K.) -
The enzymes, 4 vol. Acad. Press., 1951.

107 - SUMNER (J.B.), SOMERS (G.F.) -
Chemistry and methods of Enzymes.
1 vol. Acad. Press, 1953.

108 - THOMAS (E.W.) -
Interaction entre le lysozyme et les acetamidooses mise en évidence par spectroscopie de résonance magnétique de protons.
Biochem. Biophys. Res., 1966, 24, 5, 611-15.

109 - THOMAS (P.) -
Manuel de Biochimie.
1 vol., Masson, 1936.

110 - WAKSMAN (S.A.), WOODRUFF (M.B.) -
Selective antibiotic action of various substances of microbiological origins.
J. of Bacteriol., 1942, 44, 373-84.

111 - WIJS de (H.) , JOLLÈS (P.) -
Cell walls of three strains of mycobacteria (M. phlei, M. fortuitum and M. Kansasii) Preparation, analysis and digestion by lysozymes of different origins.
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 83, 326-332.

112 - WILLSTAETTER, GRASSMANN (W.) -
Papaïn und ähnliche pflanzliche Proteinasen.
BAMANN (E.), MYRBÄCK (K.), 2058-68.

113 - WURMSER (R.) -
Les potentiels d'oxydo réduction des systèmes biologiques.
Exp. Ann. Biochim. Med., 1° série, 1938, Masson, 71-82.

114 - YAMAMOTO (K.), MATSUSHIMA (Y.) -
Studies on amino hexoses.
XI - A synthetic substrate of Egg-white lysozyme.
Bull. Chim. Soc. Japan, 1967, 40, 1, 194-6.

115 - YAMASAKI (N.), HAYASHI (K.), FUNATSU (M.) -
Acetylation of lysozyme.
Agric. Biol. Chem., 1968, 32, 1, 55-68.

116 - ZUCKER (S.), HANES (D.J.), VOGLER (W.R.), EANES (P.Z.) -
Plasma muramidase : A study of methods and clinical applications.
J. Labo. Clin. Med., 1970, 75, 1, 83-92.

TABLE DES MATIERES

pages

Préambule 3

Introduction. Emplois thérapeutiques du lysozyme 7

P R E M I E R E P A R T I E - TRAVAUX ANTERIEURS 11

I - Dénomination de l'enzyme et le problème des substrats 13

II - Travaux antérieurs concernant nos recherches 22

1°- Différents dosages du lysozyme 22
2°- Sensibilité aux agents d'oxydation 29
3°- Thermostabilité du lysozyme 30
4°- La dialyse et l'antigénicité du lysozyme 31
5°- Les lysozymes autres que ceux du blanc d'oeuf 32

III - Composition et principales propriétés biochimiques du lysozyme 35

IV - Préparations du lysozyme à usage médicinal 38

D E U X I E M E P A R T I E - TRAVAUX PERSONNELS 41

CHAPITRE I - LES DOSAGES DU LYSOZYME 43

I - Dosage turbidimétrique du lysozyme 43
II - Dosage du lysozyme par réductimétrie 61
III - Dosage du lysozyme par diffusimétrie 64
IV - Essais de détermination d'activité amidasique puis muramidasique 66
V - Exemple d'analyse d'un chlorhydrate de lysozyme industriel et du lysozyme base 70

Conclusions du Chapitre I 74

CHAPITRE II - SENSIBILITE DU LYSOZYME VIS-A-VIS DES AGENTS D'OXYDATION 75

I - Photoinactivation de solutions de lysozyme 75

Pages

II - Essai de préparation d'un lysozyme iodé 77

Conclusions du Chapitre II 79

CHAPITRE III - LA THERMOSTABILITE DU LYSOZYME 81

I - Stabilité thermique du chlorhydrate de lysozyme en solution 81
II - Activité lysozymasique dans une poudre de blanc d'oeuf 85

Conclusions du Chapitre III 89

CHAPITRE IV - LE LYSOZYME DESTINE A LA VOIE ORALE, LA DIALYSE DU LYSOZYME 91

I - Dialyse in vitro du lysozyme 92
II - Comportement du lysozyme in vitro vis-à-vis d'enzymes du tube digestif 93
Appareil de polydialyse 98
III - Comportement du lysozyme vis-à-vis de quelques médicaments biologiques auxquels il peut être associé et de quelques levures et champignons 99
IV - Essai de démonstration de dialyse in vivo 104

Conclusions du Chapitre IV 107

CHAPITRE V - LE LYSOZYME DESTINE A LA VOIE INJECTABLE; L'ANTIGENICITE DU LYSOZYME 109

Expériences de sensibilisation de cobayes par le lysozyme 110

Conclusions du Chapitre V 115

CHAPITRE VI - RECHERCHES DE LYSOZYMES AUTRES QUE CEUX DE BLANCS D'OEUFS 117

Le lysozyme sanguin humain 118

I - Le lysozyme sérique humain 118
II - Le lysozyme des globules blancs humains 119

1- Extraction 120
2- Comportement du cobaye après injection du lysozyme de globules blancs normaux humains 122

Pages

3- Action du lysozyme des globules blancs humains sur la tumeur de GUERIN 123

Conclusions du Chapitre VI 128

CHAPITRE VII - LYSOZYMES VEGETAUX 129

I - Lysozyme de papaïne 129
II - Lysozyme de ficine 132
III - Lysozyme d'ananas 134

Conclusions du Chapitre VII 135

CONCLUSIONS GENERALES 137

BIBLIOGRAPHIE 141

EDITIONS BERGERET - 2, rue Bergeret. Tél. 91.12.59 -

2°- QUESTION PROPOSEE PAR LA FACULTE :

LA CHIMIOTHERAPIE ANTINEOPLASIQUE

Bordeaux, le 12 JUIL. 1971
Vu, le Président :
J. MASQUELIER

Bordeaux, le 23 JUIL. 1971
Vu et permis d'imprimer
Le Président de l'Université
de Bordeaux II :
H. BRICAUD